

Entwicklung eines Ablaufschemas zur miniaturisierten, biopharmazeutischen und galenischen Charakterisierung halbfester Arzneiformen am Beispiel der Corticosteroide

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Monika Katarzyna Kaca
aus Łódź / Polen

1. Referent: Professor Dr. Rolf Daniels
2. Referent: Professor Dr. Claus-Michael Lehr
eingereicht am: 21.02.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.05.2007

Druckjahr 2007

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Vorträge

Kaca M., Bock U., Daniels R., Haltner-Ukomadu E., Physicochemical profile of Testosterone and Caffeine and permeability across human skin in vitro (Vortrag), 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf (Schweiz), 2006

Poster

Kaca M., Bock U., Daniels R., Haltner-Ukomadu E., Influence of three absorption enhancers: propylene glycol, isopropyl myristate and sucrose stearate on the in vitro percutaneous permeation of caffeine, hydrocortisone and testosterone (Poster), 2nd European Congress on Life Science Process Technology, Nürnberg, 2007

Kaca M., Bock U., Daniels R., Haltner-Ukomadu E., Influence of three sorption promoters: propylene glycol, isopropyl myristate and sucrose stearate on the in vitro percutaneous permeation of caffeine, testosterone and hydrocortisone (Poster), Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam, 2007

Kaca M., Bock U., Daniels R., Haltner-Ukomadu E., Compatibility testing in the development of semisolid formulations (Poster), Skin and Formulation 2nd Symposium, Versailles (Frankreich), 2006

Kaca M., Bock U., Daniels R., Haltner-Ukomadu E., Physicochemical profile of Testosterone and Caffeine and permeability across human skin in vitro (Poster), 13th Congress on Alternatives to Animal Testing, Linz (Österreich), 2006

Kaca M., Bock U., Daniels R., Haltner-Ukomadu E., In vitro permeation and release of testosterone and caffeine from semisolid preparations (Poster), 6th International Conference and Workshop on Cell Culture and in vitro Models for Drug Absorption and Delivery, Saarbücken, 2006

Kaca M., Bock U., Daniels R., Lehr C.M., Haltner U., Physicochemical profile and permeability profile across human skin and reconstructed human epidermis (Episkin[®]) in vitro of testosterone (Poster), 1st European Congress on Life Science Process Technology, Nürnberg, 2005

Kaca M., Bock U., Daniels R., Lehr C.M., Haltner E., Development scheme for topical formulations with Corticosteroids utilizing physicochemical and in vitro methods (Poster), 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Berlin, 2005

Kaca M., Bock U., Daniels R., Lehr C.M., Haltner E., Development scheme for topical formulations with Corticosteroids utilizing physicochemical and in vitro methods (Poster), 32nd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Miami (USA), 2005

Meinem Mann

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels in der Firma Across Barriers GmbH in Saarbrücken.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels

danke ich herzlich für die Zuweisung des interessanten Dissertationsthemas, die Unterstützung bei der Bearbeitung dieser Arbeit sowie die stets freundliche Betreuung während der Promotionsphase.

Frau Dr. Eleonore Haltner-Ukomadu danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme in die Firma, die finanzielle Unterstützung der Arbeit und die wissenschaftlichen Anregungen.

Herrn Dr. Udo Bock, meinem Betreuer in der Firma, danke ich für die beste Betreuung und die fachlichen Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern bei Across Barriers GmbH für das angenehme Arbeitsklima und für die Unterstützung für meine Arbeit. Insbesondere gilt dieser Dank Herrn Tawfik Jalal, der mich in den chemischen Analysen unterstützt hat und der ein kompetenter Ansprechpartner bei allen meinen Fragen war. Mein Dank gilt ebenso Frau Nadine Berg, Frau Sabine Maus und Frau Julia Kosel, die einen erheblichen Teil der praktischen Arbeit begleitet und mitgetragen haben und meine „tausende“ Proben vermessen haben. Herrn Eric Siewertsen und Frau Christiane Becker danke ich für die Korrekturen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Claus-Michael Lehr danke ich herzlich für die Anfertigung des Zweitgutachtens und für Aufnahme in die Doktorandenseminare.

Ich danke technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes in Saarbrücken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Namentlich hervorheben möchte ich an dieser Stelle Herrn Frank Netzlaff, Herrn Dr. Marc Schneider und Herrn Sebastian Tätz. Herrn Dr. Ulrich Schäfer möchte ich mich herzlichst für die fachliche Ratschläge sowie für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Des weiteren danke ich technischen und wissenschaftlichen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig für die Unterstützung bei der Arbeit. Vor allem sind hier zu erwähnen Frau

Danksagung

Dr. Christina Hoffmann (für die stets freundliche Bereitschaft auf meine Fragen zu antworten) und Frau Susen Oliczewski (für die Unterstützung bei der Grundlagenherstellung).

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Technologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen aussprechen. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Klaus Weyhing für seine hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Arbeit und Herrn Stefan Maurath, der mich bei der Untersuchung zur Formulierungsstabilität unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich der Firma Syntapharm, Müllheim für die Überlassung von Versuchssubstanzen (Zuckerester) danken.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung	1
1.1.	Einleitung	1
1.2.	Zielsetzung	3
2.	Theoretische Grundlagen	5
2.1.	Haut und deren Einfluss auf die Wirkstoffaufnahme.....	5
2.2.	Einfluss des Wirkstoffs auf die Aufnahme in die Haut.....	8
2.3.	Halbfeste Zubereitungen und deren Einfluss auf die Wirkstoffaufnahme in die Haut .	10
2.3.1.	Optimierung halbfester Zubereitungen bezüglich der Transportrate	13
3.	Untersuchung der Prüfverfahren zur präklinischen Entwicklung halbfester Darreichungsformen	15
3.1.	Wirkstoffe.....	16
3.1.1.	Physikochemische Charakterisierung der Modellsubstanzen	16
3.1.2.	Vorhersage der Permeationsgeschwindigkeit der Modellsubstanzen anhand zwei kommerzieller in silico Modelle.....	17
3.2.	Grundlagen und deren Charakterisierung	17
3.3.	Formulierungen und deren Charakterisierung.....	17
3.3.1.	Physikochemische Formulierungscharakterisierung.....	17
3.3.2.	Biopharmazeutische Formulierungscharakterisierung (Testphase I).....	18
3.4.	Optimierung der halbfesten Zubereitungen (Testphase II)	18
4.	Modellsubstanzen und deren Charakterisierung.....	19
4.1.	Modellsubstanzen.....	19
4.2.	Physikochemische Charakterisierung der Modellsubstanzen	24
4.2.1.	Nephelometrische Löslichkeitsbestimmung	25
4.2.2.	Sättigungslöslichkeit im Akzeptormedium.....	27
4.2.3.	Schmelzpunkte	28
4.2.4.	Indikatoren für die Membranpermeabilität	29
4.2.5.	Proteinbindung	33
4.2.6.	Intrinsische Stabilität.....	34
4.3.	Vorhersage des Permeabilitätskoeffizienten anhand von in silico Modellen	41
4.4.	Zusammenfassung und Diskussion	43
5.	Herstellung der Grundlagen und deren Charakterisierung	47
5.1.	Grundlagenauswahl	47
5.2.	Kompatibilität.....	48
5.3.	Charakterisierung der Grundlagen	50
5.3.1.	Prüfung der Konsistenz durch Penetrometrie	50
5.3.2.	Prüfung der Dichte	51
5.3.3.	Prüfung der Spreitung	51
5.3.4.	Untersuchung der rheologischen Eigenschaften	52
5.4.	Zusammenfassung und Diskussion	59
6.	Formulierungen und deren Charakterisierung.....	62
6.1.	Wirkstoffinkorporation.....	62
6.2.	Wirkstoffzustand in der Zubereitung	62

6.3.	Freisetzung	64
6.4.	Permeationsuntersuchungen	68
6.4.1.	Hautmembranauswahl	69
6.4.2.	Über hitzeseparierte Humanhaut	71
6.4.3.	Vergleich der Testosteronpermeation aus den drei Grundlagen über das Episkin-Modell und über dermatomisierte Humanhaut	74
6.4.4.	Vergleich mit anhand von in silico Modellen vorhersagten P_{app} -Werten	76
6.5.	Einfluss der Freisetzungsgeschwindigkeit auf die Permeation	77
6.6.	Stabilität der Formulierungen	78
6.6.1.	Visuelle Beurteilung	79
6.6.2.	Änderungen im pH-Wert der Zubereitungen	82
6.6.3.	Konsistenzänderung	82
6.6.4.	Quantitative Beurteilung	84
6.6.5.	Änderungen in der Freisetzungsrage	86
6.7.	Zusammenfassung und Diskussion	88
7.	Optimierung der halbfesten Zubereitungen	95
7.1.	Permeationsbeschleunigerauswahl	96
7.1.1.	Isopropylmyristat	97
7.1.2.	Propylenglycol	97
7.1.3.	Saccharosestearat	98
7.2.	Kompatibilität der aktiven Substanz mit den Enhancern	100
7.3.	Modellsubstanzen	100
7.4.	Grundlagen	100
7.5.	Charakterisierung der Grundlagen	101
7.5.1.	Viskositätsbestimmung	101
7.5.2.	Bestimmung des pH-Werts	102
7.6.	Sättigungslöslichkeit in der Formulierung	104
7.7.	Permeationsuntersuchungen	110
7.7.1.	Hydrocortison	113
7.7.2.	Testosteron	114
7.7.3.	Koffein	115
7.8.	Zusammenfassung und Diskussion	116
8.	Abschließende Diskussion	123
9.	Zusammenfassung und Ausblick	133
9.1.	Zusammenfassung	133
9.2.	Ausblick	135
10.	Methoden/Experimenteller Teil	138
10.1.	Analytische Methode	138
10.1.1.	HPLC	138
10.1.2.	LSC	140
10.2.	Löslichkeitsbestimmung	140
10.2.1.	Nephelometrische Löslichkeit	140
10.2.2.	Sättigungslöslichkeit	141
10.3.	Schmelzpunkte	141
10.4.	Indikatoren für die Membranpermeabilität	141
10.4.1.	Verteilungskoeffizient Log P	141
10.4.2.	K_{IAM} -Wert	142

10.5.	Proteinbindung	144
10.6.	Stabilität der Testsubstanzen.....	145
10.6.1.	Stabilität in Lösung	145
10.6.2.	Stabilität der Feststoffe	146
10.6.3.	Aufbereitung der Proben zur Analyse.....	146
10.6.4.	Auswertung	146
10.7.	Herstellung der Grundlagen für Phase I.....	146
10.7.1.	Herstellung der Basiscreme DAC	147
10.7.2.	Herstellung der Wollwachsalkoholsalbe DAB 1996	148
10.7.3.	Herstellung des Carbomergels DAB.....	148
10.7.4.	Wirkstoffinkorporation	149
10.8.	Kompatibilität	149
10.9.	Grundlagencharakterisierung	150
10.9.1.	Prüfung der Konsistenz durch Penetrometrie	150
10.9.2.	Prüfung der Dichte	150
10.9.3.	Prüfung der Spreitung	150
10.9.4.	Untersuchung der rheologischen Eigenschaften	151
10.10.	Wirkstofffreisetzung aus den Formulierungen	152
10.11.	Haut.....	153
10.11.1.	Hitzeseparation.....	153
10.11.2.	Dermatomisieren	154
10.12.	Permeationsexperimente	155
10.12.1.	Berechnung von P_{app} -Wert und Lag Phase	155
10.12.2.	Transport über hitzeseparierte humane Haut	155
10.12.3.	Transport über dermatomisierte Humanhaut	156
10.12.4.	Transport über Episkin®	157
10.13.	Formulierungsstabilität	158
10.13.1.	Visuelle Beurteilung	159
10.13.2.	pH Kontrolle	160
10.13.3.	Viskositätsprüfung	160
10.13.4.	Gehaltsbestimmung (Extraktionsverfahren)	160
10.13.5.	Freisetzung	162
10.14.	Herstellung der Grundlagen für Phase II	162
10.15.	Viskositätsbestimmung der Grundlagen aus der Phase II.....	164
10.16.	Statistische Auswertung	165
10.17.	Liste der verwendeten Substanzen und Geräten	165
Anhang 1	168
Anhang 2	173
Anhang 3	175
Literaturverzeichnis	185
Wissenschaftliche Veröffentlichungen allgemeiner Art	199

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Einleitung

Die Haut bietet sich zur Applikation von pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen an. Die kutane Wirkstoffapplikation eröffnet Möglichkeiten zur Umgehung der ersten Leberpassage, guter „Compliance“, guter Kontrolle über die Arzneistoffzufuhr, sowie eine schmerzfreie Applikation. Die dermale Applikation von Arzneimitteln und Wirkstoffen der kosmetischen Industrie gewinnt somit in den letzten Jahren auf Grund ihrer einfachen Anwendung und der oben genannten Vorteile zunehmend an Bedeutung. Die Produkte zur transdermalen und dermalen Applikation repräsentieren z.B. in den USA 30% von 77 neuen Produktkandidaten in der vorklinischen Entwicklung [Barry 2001]. Ein anderer Trend zeigt, dass neue dermale Produkte als „line extension“ zu den bestehenden Produkten angeboten werden. Mit diesem stetig wachsenden Interesse an halbfesten Zubereitungen steigt auch der Bedarf an zeit- und kostengünstigen Methoden bei ihrer Entwicklung. Nur ein kleiner Bruchteil der neuen Wirkstoffkandidaten aus der vorklinischen Phase erreicht die Marktreife [Avdeef und Testa 2002]. Auf Grund sehr hoher Kosten, mit denen vorklinische und klinische Studien verbunden sind, ist es wichtig, die besten Wirkstoffkandidaten und Formulierungen in kürzester Zeit zu erkennen. Davon ausgehend ist es offensichtlich, dass neue effektive Strategien bei der präklinischen Entwicklung halbfester Formulierungen benötigt werden, um die besten Kandidaten früh zu identifizieren und die besten Darreichungsformen schnell zu entwickeln.

Man unterscheidet die systemische und die lokale Wirkung eines Wirkstoffs. Von systemischer Anwendung spricht man bei Wirkstoffen, die die Hautschichten durchdringen, in den Blutkreislauf aufgenommen werden und über die Blutbahn zum vorgesehenen Ort ihrer Wirkung gelangen. Demgegenüber wirkt ein Wirkstoff lokal, wenn sich sein Wirkungsort auf oder in der Haut selbst befindet. Die Aufnahme einer Substanz in die Haut und durch die Haut hängt von einem komplexen Wechselspiel zwischen Wirkstoff-, Vehikel- und Hauteigenschaften ab. Der gesamte Aufnahmeprozess über die Haut lässt sich in verschiedene Schritte unterteilen. Zuerst erfolgt die Liberation der aktiven Substanz aus der halbfesten Zubereitung. Dies umfasst die Diffusion des gelösten Wirkstoffs bis zur Grenze Vehikel/Hornschicht. Um einen Effekt in der Haut zu erzielen, muss der Wirkstoff nach seiner Freigabe aus der Formulierung in die Haut penetrieren. Die halbfeste Formulierung muss an dieser Stelle einen entscheidenden Beitrag leisten, damit ein Wirkstoff diese Barriere überschreiten kann. Nach dem Überwinden der epidermalen Barriere erfolgt die Penetration

in tiefere Epidermisschichten und in die Dermis. In der Dermis kann der Wirkstoff über die Kapillargefäße in die systemische Zirkulation gelangen. Für die meisten Wirkstoffe ist die Geschwindigkeit der perkutanen Absorption bei einer intakten Hautbarriere um Größenordnungen niedriger als deren Freisetzung aus der Formulierung [Malzfeld et al. 1989].

Verglichen mit der Entwicklung oraler Arzneiformen und den damit verbundenen Ablauf- und Prüfverfahren während der Entwicklung in der pharmazeutischen Industrie, sind die Prüfungen für halbfeste Dermatika/Kosmetika in deutlich höherem Ausmaß komplex. Dies ist auf die stärkere Wechselwirkung zwischen API/ACI (Active Pharmaceutical/Cosmetic Ingredient) und der Grundlage sowie den komplizierten Einfluss beider auf den Applikationsort der Haut zurückzuführen. Es ist allgemein bekannt, dass sogar wirkstofffreie halbfeste Grundlagen einen therapeutischen Effekt auslösen können. Daraus ergeben sich einige wesentliche Anforderungen, die an eine pharmazeutische oder kosmetische Zubereitung gestellt werden müssen. Die Formulierungen sollen zunächst den gewünschten Wirkstofftransport über die Haut gewährleisten. Die Produkte sollten eine hohe chemische, physikalische und mikrobiologische Stabilität aufweisen und sich inert gegenüber Wirkstoffen verhalten. Darüber hinaus sollen sie ein gutes Carriersystem für die Wirkstoffe darstellen. Das Penetrationsvermögen in die Haut und die Verweilzeit des Wirkstoffes in und auf der Haut können durch die Art der Formulierung beeinflusst werden. Daraus resultiert, dass die Auswahl der geeigneten Formulierung bzw. der Bestandteile komplex ist und sehr viel Zeit in Anspruch nimmt.

Daher sollten die pharmakokinetischen Eigenschaften neuer Wirkstoffkandidaten möglichst früh in der Entwicklungsphase erkannt werden. Eine effektive präklinische Entwicklung halbfester Formulierungen sollte mit der Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs anfangen, um wichtige Informationen zur Auswahl der Grundlage zu erhalten. Bei der Formulierungsentwicklung sind Inkompatibilitäten seitens der Hilfsstoffe und des Wirkstoffes zu vermeiden und die Darreichungsformen sind in vitro an verschiedenen Modellsystemen auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zu untersuchen. Weitere Herausforderungen sind die höhere Potenz, die steigende Molmasse und die höhere Lipophilie neuer Wirkstoffe [Lipinski 2002]. Eine höhere Wirkstoffpotenz führt dazu, dass niedrigere Wirkstoffkonzentrationen in der Formulierung notwendig sind. Dadurch wird die Charakterisierung der Formulierung schwieriger und sensitivere analytische Methoden sind gefragt. Eine steigende Molmasse behindert die Permeation und Penetration der Substanz. Eine im Vergleich zu älteren Wirkstoffen höhere Lipophilie der Substanz begrenzt ihre

Löslichkeit in Wasser und ihre Permeabilität. Bei der Entwicklung halbfester Zubereitungen müssen solche Charakteristika des Wirkstoffs berücksichtigt werden.

Bei der Entwicklung von Formulierungen mit neuen Wirkstoffkandidaten ist auf Grund der sehr kostenintensiven Synthese der neuen Substanzen die vorhandene Wirkstoffmenge meistens sehr begrenzt. Dieses Problem gibt es auch bei oralen Darreichungsformen. Daher existieren seit längerer Zeit Bestrebungen, die Entwicklung oraler Arzneiformen mit einer möglichst kleinen Menge der aktiven Substanz durchzuführen. Balbach und Korn haben bei der Wirkstoffkandidatenentwicklung eine Strategie für die orale Darreichungsformen vorgeschlagen, bei der nicht mehr als 100 mg der Substanz verbraucht werden [Balbach und Korn 2004]. Analog besteht ein großer Bedarf nach einer Strategie für die dermale und transdermale Applikation. Das Ziel ist, mit sehr kleinen Substanz- und somit Formulierungsmengen in der präklinischen Entwicklung von halbfesten Formulierungen auszukommen. Neben der Miniaturisierung des Verfahrens wird heutzutage eine Verkürzung der Entwicklungszyklen angestrebt, das resultiert sowohl aus den hohen Kosten der Entwicklung, als auch aus dem Wettbewerb mit anderen Unternehmen [Balbach und Korn 2004, Maas et al. 2006, Avdeef und Testa 2002]. Diese Anforderungen müssen auch bei der Entwicklung von halbfesten Zubereitungen berücksichtigt werden. Aus dem eben Dargestellten resultiert in der frühen Entwicklungsphase von halbfesten Darreichungsformen ein Bedarf an schnellen, kostengünstigen und miniaturisierten Verfahren, die die Auswahl der optimalen Formulationsansätze aus einer Vielzahl von Wirkstoffkandidaten und Grundlagen für die klinische Phase ermöglichen.

1.2. Zielsetzung

Das erste Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Evaluierung der Prüfverfahren zur präklinischen Entwicklung halbfester Produkte im pharmazeutischen und kosmetischen Bereich am Beispiel der Wirkstoffklasse der Corticosteroide. Dabei waren die wichtigsten Aufgaben:

- physikochemische Charakterisierung der Modellsubstanzen hinsichtlich ihrer für die Formulierung und den Transport über die Haut bedeutenden Eigenschaften
- Vorhersage der Permeationsgeschwindigkeit der Modellsubstanzen mit Hilfe von in silico Modellbetrachtungen
- physikochemische Untersuchung der Grundlagen und Identifizierung von Testmethoden für Grundlagen, um deren Einfluss auf die Wirkstoffaufnahme in die Haut abzuschätzen

- physikochemische und biopharmazeutische in vitro Charakterisierung von Formulierungen
- Untersuchung des Einflusses von Hilfsstoffe auf den Wirkstofftransport und damit Identifizierung permeationsfördernder Additive
- abschließende Bewertung der angesetzten Prüfverfahren zur Entwicklung halbfester Darreichungsformen.

Auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse sollte ein zweites, zentrales Ziel verfolgt werden: Es sollten Empfehlungen abgeleitet werden, welche für die angewandten Methoden zur Vorbereitung der klinischen Entwicklung in Bezug auf die Formulierung und Vorhersage der Pharmakokinetik notwendig und effizient sind. Hierzu sollte ein rationales Ablauf- und Prüfschema zur Entwicklung halbfester Zubereitungen erstellt werden. **Diese Arbeit hatte somit zur Aufgabe, eine neue Strategie zu erstellen, um die präklinische Entwicklung halbfester Produkte im pharmazeutischen und kosmetischen Bereich schneller und kostengünstiger zu gestalten.** Dadurch sollte die Möglichkeit eröffnet werden, in der früheren Entwicklungsphase von halbfesten Arzneimitteln und Kosmetika eine größere Zahl von Wirkstoffkandidaten und Grundlagen zu untersuchen sowie große Datensätze von aussagefähigen Resultaten zu erstellen. Am Ende sollte ein Weg gewiesen werden, um die Produktentwicklung von halbfesten Arzneimitteln und Kosmetika ressourcenschonend (Substanzverbrauch, Formulierungsmenge, Zeit, Kapazität) und ohne Tierstudien zu ermöglichen sowie die in vivo Prüfungen im regulatorischen Umfeld bestmöglich vorzubereiten.

2. Theoretische Grundlagen

Die Aufnahme einer Substanz in die Haut wird von einem komplexen Wechselspiel zwischen Wirkstoff, Vehikel und Haut geprägt. Die wichtigsten Faktoren, die die Aufnahme eines Wirkstoffs aus einer Grundlage in die Haut beeinflussen, sind in Abb. 2.1 dargestellt.

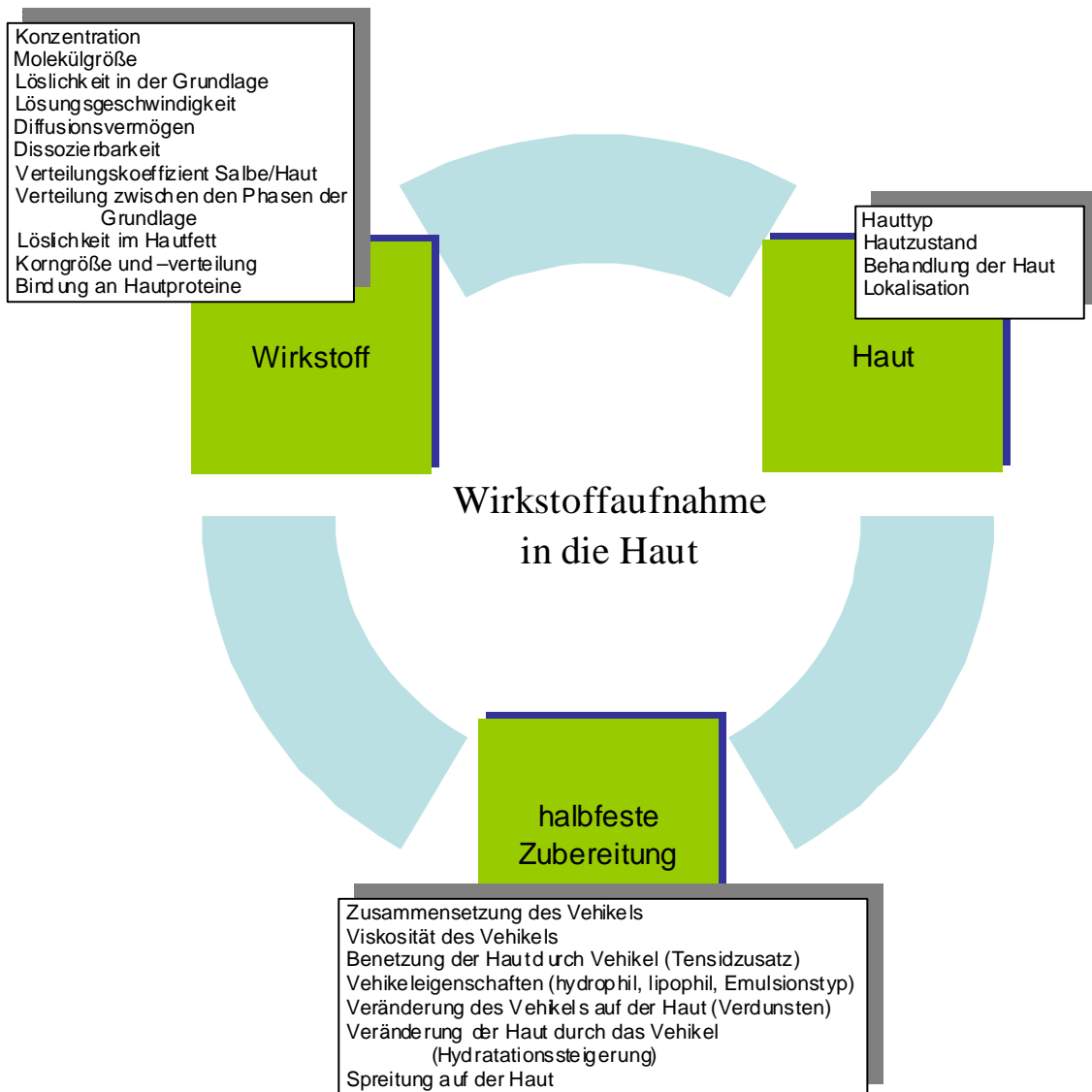


Abb. 2.1: Faktoren, die die Aufnahme eines Wirkstoffs aus einer Grundlage in die Haut beeinflussen

2.1. Haut und deren Einfluss auf die Wirkstoffaufnahme

Die Haut, das größte Organ des menschlichen Körpers, stellt eine Barriere zwischen der Umwelt und der Innenwelt des Körpers dar [Stevens und Lowe 1997]. Ihr Aufbau variiert in Abhängigkeit von der Körperregion und ihren speziellen Funktionen. Ihre Aufgabe ist es, den fortwährenden Veränderungen der äußeren Umweltbedingungen standzuhalten und den biologischen Prozessen im Organismus ein gleichbleibendes Milieu zur Verfügung zu stellen.

Die Haut bietet dem Organismus somit einen mechanischen Schutz und ist wichtigster Temperaturregulator des Körpers. Sie verhindert das Austrocknen des Organismus, die Vermehrung von pathogenen Bakterien durch ihren „Säureschutzmantel“ und hält kurzweilige Strahlung ab [Müller-Goymann und Refai 2000, Arens-Corell 2001]. Zu ihren zahlreichen Funktionen gehören ebenfalls Sinneswahrnehmung, Immunabwehr und der Schutz des Organismus vor dem Eindringen chemischer Substanzen. Trotz ihrer geringen Dicke ist die Haut für die meisten Substanzen überraschend undurchlässig.

Die äußerste Schicht der Haut, das Stratum corneum, besteht aus verhornten abgestorbenen Zellen, die zusammen mit der Lipidmatrix, in die sie eingebettet sind, die eigentliche Barriere der Haut bilden. Der Aufbau der Hornschicht wird oft mit einer Backsteinmauerstruktur verglichen, die aus Corneozyten als „Backsteinen“ und der Lipidmatrix als „Zement“ besteht [Müller-Goymann und Refai 2000]. Im Gegensatz zu dem überwiegend lipophilen Stratum corneum sind die weiteren Hautschichten, lebende Epidermis und Dermis, hydrophil. Kleine wasserlösliche Moleküle können ca. 1000 mal schneller systemisch aufgenommen werden, wenn die Hornschicht beschädigt oder abwesend ist [Barry 2001]. Dagegen behindert für sehr lipophile Substanzen die hydrophile Schicht der lebenden Epidermis und der Dermis den transdermalen Transport [Wagner 2001, Voigt 1995].

Aus pharmazeutisch-technologischer Sicht bildet die Haut eine mehrschichtige Diffusionsbarriere zwischen topisch applizierten Arzneimitteln und dem Körperinneren. Der gesamte Transportprozess lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen, wobei der langsamste Schritt die gesamte Prozessgeschwindigkeit bestimmt. Zuerst erfolgt die Freisetzung der aktiven Substanz aus der Formulierung, d.h. die Diffusion des gelösten Wirkstoffs bis zur Grenze Vehikel/Hornschicht. Anschließend dringt der Wirkstoff in die Haut ein. Nach dem Überwinden der epidermalen Barriere erfolgt die Penetration in tiefere Epidermisschichten und in die Dermis. In der Dermis kann der Wirkstoff in vivo in die systemische Zirkulation gelangen. Der Diffusionsvorgang eines Wirkstoffs aus der Formulierung über die Humanhaut ist in Abb. 2.2 und Gleichung 2.1 dargestellt.

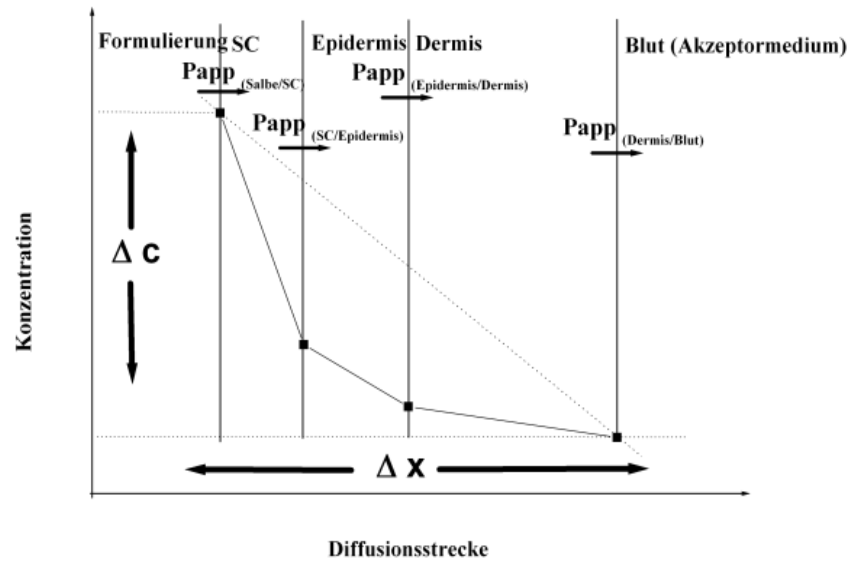


Abb. 2.2: WS-Diffusionsvorgang aus der Formulierung über die Haut

$$\frac{1}{P_{app(transdermal)}} = \frac{1}{P_{app(Formulierung / SC)}} + \frac{1}{P_{app(SC / Epidermis)}} + \frac{1}{P_{app(Epidermis / Dermis)}} + \frac{1}{P_{app(Dermis / Blut)}}$$

Gleichung 2.1

wobei:

$P_{app}(\text{Formulierung/SC})$	Diffusion aus der Formulierung bis zum Stratum corneum
$P_{app}(\text{SC/Epidermis})$	Diffusion aus dem Stratum corneum bis zur tieferen Epidermis
$P_{app}(\text{Epidermis/Dermis})$	Diffusion aus der Epidermis bis zur Dermis
$P_{app}(\text{Dermis/Blut})$	Diffusion aus der Dermis bis zum Blut (Akzeptormedium)

Wenn der Widerstand einer Schicht sehr viel größer als der anderer Schichten ist, wird diese Schicht allein geschwindigkeitsbestimmend und determiniert die Permeabilität.

Die Wirkstoffaufnahme in die Haut wird von physiologischen Gegebenheiten des Applikationsortes, wie Hauttyp, Hautzustand und Körperregion, beeinflusst. Neben diesen Faktoren spielt auch die Vorbehandlung der Haut eine wichtige Rolle. Es ist allgemein bekannt, dass durch Wärmebehandlung und durch Okklusion eine Verstärkung der Wirkstoffabsorption zu erwarten ist [Daniels 2004, Loth 1991, Voigt 1995]. Da jedoch im Zentrum dieser Arbeit galenische Formulierungsentwicklung steht, werden hier vor allem Faktoren, die mit der halbfesten Darreichungsform und mit dem Wirkstoff selbst verbunden sind, untersucht und diskutiert.

2.2. Einfluss des Wirkstoffs auf die Aufnahme in die Haut

Zu den wichtigsten Eigenschaften des Wirkstoffs, die die kutane Resorption und Produktqualität beeinflussen, gehören die Molekülgröße, der Diffusionskoeffizient, die Dissozierbarkeit, die thermodynamische Aktivität, die Sättigungslöslichkeit in der Zubereitung, die Polarität, die Lipophilie, der Verteilungskoeffizient zwischen dem Vehikel und der Haut sowie die Affinität zur Haut. Um diese Wirkstofffaktoren näher betrachten zu können, werden im folgenden grundlegende Gleichungen für den Wirkstofftransport über die Haut dargestellt. Der Transport durch die Haut wird mathematisch durch die passive Diffusion beschrieben, wobei das Stratum corneum vereinfacht als isotrope Verteilungsmembran betrachtet wird. Unter der Voraussetzung von Sink-Bedingungen in der lebenden Epidermis stellt sich in Abhängigkeit der Zeit in der Hornschicht ein linearer Konzentrationsgradient ein. In diesem quasistationären Zustand lässt sich das 1. Ficksche Gesetz anwenden:

$$-\frac{dc_v}{dt} = \frac{D_{sc} \cdot F \cdot VK_{sc/v}}{d_{sc} \cdot V} \cdot c_v = kp_1 \cdot c_v \quad \text{Gleichung 2.2}$$

$\frac{dc_v}{dt}$	Konzentrationsänderung des Wirkstoffs pro Zeit im Vehikel
D_{sc}	effektiver Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs im Stratum corneum
F	Diffusionsfläche
$VK_{sc/v}$	Verteilungskoeffizient des Wirkstoffs zwischen Stratum corneum und Vehikel
d_{sc}	Dicke des Stratum corneum
V	appliziertes Vehikelvolumen
c_v	eingesetzte Wirkstoffkonzentration im Vehikel
kp_1	Penetrationsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung

Aus Gleichung 2.2 wird deutlich, dass die Konzentrationsabnahme in der Grundlage pro Zeiteinheit in einer auf die Haut applizierten Zubereitung direkt proportional zu dem Diffusionskoeffizienten, dem Verteilungskoeffizienten, der Diffusionsfläche und der eingesetzten Wirkstoffkonzentration im Vehikel ist. Das Diffusionsvermögen der Substanz in der Zubereitung und in der Haut hängt von ihrer Molekülgröße, der Viskosität des Vehikels, Interaktionen des Wirkstoffs mit dem Vehikel und mit der Haut ab. Die Molmasse verhält sich umgekehrt proportional zum Diffusionskoeffizienten. So können große Moleküle mit einer Molmasse oberhalb von 500 g/mol nur sehr schwer durch die Haut diffundieren [Sanco 2004, Barry 2001]. Der Verteilungskoeffizient einer Substanz zwischen dem Stratum

corneum und dem Vehikel hängt von ihrer Löslichkeit in der Hornschicht und in der Zubereitung ab [Walker und Smith 1996]. Substanzen mit niedriger Affinität zu den Stratum corneum-Komponenten werden nur in einem kleinen Ausmaß durch die Haut transportiert [Liesen 2003]. Der Verteilungskoeffizient zwischen dem Stratum corneum und dem Vehikel wird sehr oft zum Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient vereinfacht [Fitzpatrick et al. 2004]. Niedrig permeable Substanzen besitzen in der Regel einen Log P-Wert unterhalb von -1 oder oberhalb von +4. Neben diesen Faktoren ist auch die Bindung der aktiven Substanz an hauteigene Proteine und andere Gewebebestandteile sowie gegebenenfalls die Biotransformation des Wirkstoffs in der Haut bei der Entwicklung der halbfesten Formulierungen zu beachten. Des Weiteren ist der Ladungszustand der Substanz ein wichtiger Parameter. Eine nicht ionisierte Substanz kann leichter durch die Haut permeieren als die ionisierte Form [Cazares-Delgadillo et al. 2005]. Somit müssen der pKa-Wert des Wirkstoffs und der pH-Wert der Grundlage bei der präklinischen Entwicklungsphase berücksichtigt werden.

Zur Vereinfachung der Gleichung 2.2 werden die Faktoren D_{Sc} , $VK_{Sc/V}$ und d_{Sc} zum apparenten Permeationskoeffizienten zusammengefasst:

$$P_{app} = \frac{D_{Sc} \cdot VK_{Sc/V}}{d_{Sc}} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Der apparente Permeationskoeffizient ist unabhängig von der eingesetzten Wirkstoffkonzentration. Der Wirkstoffflux ist die diffundierte Wirkstoffmenge pro Flächen- und Zeiteinheit und berücksichtigt die Wirkstoffkonzentration im Vehikel:

$$J = \frac{D_{Sc} \cdot VK_{Sc/V}}{d_{Sc}} \cdot c_V = P_{app} \cdot c_V \quad \text{Gleichung 2.4}$$

Wenn eine maximale thermodynamische Aktivität im Vehikel erreicht wird, sind auch die erreichten Fluxes maximal:

$$J_{max} = P_{app} \cdot c_{sV} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

c_{sV} Sättigungskonzentration des Wirkstoffs im Vehikel

Der Verteilungskoeffizient des Wirkstoffs zwischen dem Stratum corneum und Vehikel kann durch die Sättigungskonzentration in den beiden Phasen angenähert werden. Daraus ergibt sich:

$$J_{max} = \frac{D_{Sc} \cdot c_{sSc}}{d_{Sc} \cdot c_{sV}} \cdot c_{sV} = \frac{D_{Sc} \cdot c_{sSc}}{d_{Sc}} \quad \text{Gleichung 2.6}$$

c_{sSc} Sättigungskonzentration des Wirkstoffs im Stratum corneum

Aus der Gleichung 2.6 ist deutlich, dass nicht die Löslichkeit in dem Vehikel, sondern die Sättigungslöslichkeit im Stratum corneum der Hauptfaktor ist, der den Wirkstofftransport durch das Stratum corneum beeinflusst -jedoch nur, so lange eine ausreichende Menge an freier Substanz vorliegt, die im Stande ist, die Barriere zu sättigen. Die Gleichung 2.6 zeigt, dass der maximale Flux eines Wirkstoffs nur von seinem Diffusionskoeffizienten in der Hornschicht, der Dicke der Barriere und seiner Sättigungslöslichkeit im Stratum corneum abhängig ist. Demnach sollte der maximale Flux eines Wirkstoffs aus verschiedenen Vehikeln immer gleich sein, solange keine Interaktionen zwischen dem Vehikel, der Barriere und dem Wirkstoff auftreten, wie sie z.B. durch die Zugabe von Penetrationsbeschleunigern erreicht werden [Lieken 2003].

2.3. Halbfeste Zubereitungen und deren Einfluss auf die Wirkstoffaufnahme in die Haut

Da die Entwicklung und Eigenschaften halbfester Formulierungen im Zentrum dieser Arbeit stehen, wird hier kurz auf ihre Klassifizierung nach dem Arzneibuch eingegangen [EU 2002]. Halbfeste Zubereitungen sind Darreichungsformen, die im allgemeinen im Temperaturbereich zwischen Raumtemperatur und Hauttemperatur streichfähig sind und dadurch von den flüssigen Darreichungsformen und festen Systemen differenziert werden können [Rose 1999]. Aus rheologischer Sicht sind sie durch das Vorhandensein einer Fließgrenze charakterisiert [Barry 1983]. Auf Grund ihrer rheologischen Eigenschaften zeigen halbfeste Darreichungsformen viele Vorteile in Bezug auf ihre Herstellung, ihre Applikation auf die Haut, ihre Adhäsion an die Applikationsfläche sowie auf ihre Fähigkeit viele Substanzen zu transportieren [Alberti et al. 2005]. Halbfeste Zubereitungen sind zur Applikation auf die Haut und einige Schleimhäuten bestimmt. Die Zubereitungen dürfen geeignete Zusätze wie Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Antioxidantien und Verdickungsmittel erhalten. Das Arzneibuch unterscheidet streichfähige Darreichungsformen in Salben, Cremes, Gelen, Pasten, Umschlagpasten und medizinischen Pflastern (Abb. 2.3).

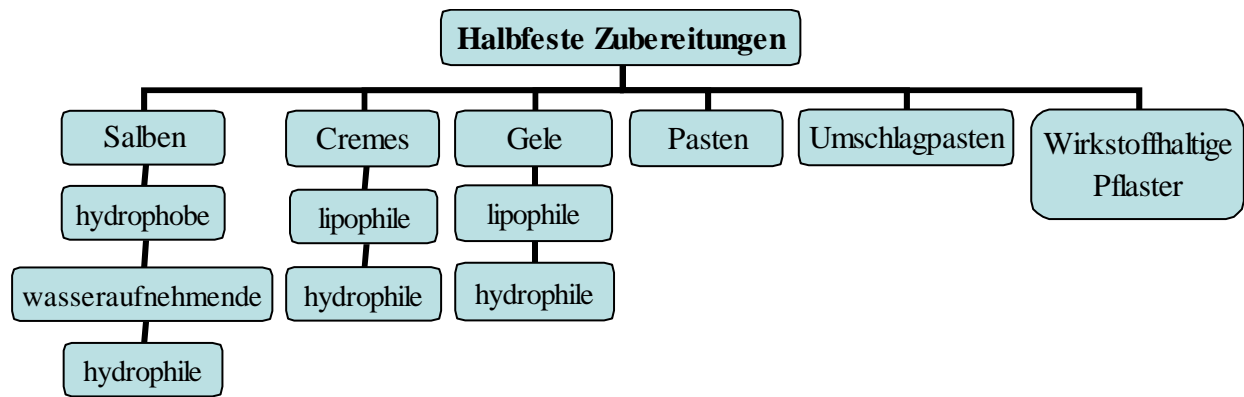


Abb. 2.3: Aufteilung der halbfesten Zubereitungen

Salben bestehen aus einer einheitlichen Grundlage, in welcher feste oder flüssige Substanzen gelöst oder suspendiert vorliegen können. Dabei kann man hydrophobe, wasseraufnehmende und hydrophile Grundlagen unterscheiden. Hydrophobe Salben können nur kleine Mengen an Wasser aufnehmen. Im Gegensatz dazu sind hydrophile Salben, die üblicherweise aus einer Mischung von festen und flüssigen Macrogolen bestehen, mit Wasser mischbar. Die dritte Salbenart, wasseraufnehmende Salben, sind hydrophobe Salben, die größere Mengen Wasser aufnehmen können. In Abhängigkeit von der Art des eingearbeiteten Emulgators bilden wasseraufnehmende Salben Emulsionen vom Wasser-in-Öl-Typ oder Öl-in-Wasser-Typ. Im Vergleich zu Salben sind Cremes mehrphasige Zubereitungen, die aus einer lipophilen und einer wässrigen Phase bestehen. Auf Grund des verwendeten Emulgatortyps werden lipophile und hydrophile Cremes unterschieden. Lipophile Cremes enthalten Wasser-in-Öl-Emulgatoren. Bei diesen Zubereitungen ist die zusammenhängende Phase lipophil. Im Gegensatz dazu ist bei hydrophilen Cremes die äußere Phase wässrig. Hydrophile Cremes enthalten Emulgatoren vom Typ Öl-in-Wasser. Der dritte Grundlagentyp, die Gele, sind flüssigkeitsreiche, halbfeste Zubereitungen, die durch Quellung von organischen Makromolekülen und anorganischen Stoffen erhalten werden [Voigt 1995]. Gele werden in Oleogele und Hydrogele unterteilt. Grundlagen lipophiler Gele bestehen üblicherweise aus flüssigem Paraffin mit Zusatz von Polyethylen oder aus fetten Ölen, die durch Zusatz von kolloidalem Siliciumdioxid, Aluminium- oder Zinkseifen geliert werden. Im Gegensatz dazu sind hydrophile Gele Zubereitungen, deren Grundlagen üblicherweise aus Wasser, Glycerol oder Propylenglycol bestehen, die mit geeigneten Quellstoffen geliert werden. Halbfeste Systeme mit hohem fein dispergiertem Feststoffanteil werden als Pasten bezeichnet. Pasten stellen einen Übergangsbereich zwischen hochkonzentrierten Suspensionen und feuchten Pudern dar. Der vierte Zubereitungstyp, Umschlagpasten, bestehen aus einer hydrophilen, hitzespeichernden Grundlage, in der feste oder flüssige Wirkstoffe dispergiert sind.

Umschlagpasten werden üblicherweise in dicker Schicht auf ein geeignetes Tuch aufgestrichen und vor Auflegen auf die Haut erhitzt. Der letzte Grundlagentyp, wirkstoffhaltige Pflaster, besteht aus einer klebstoffhaltigen Grundlage, die einen oder mehrere Wirkstoffe enthalten kann. Diese Grundlage ist als gleichmäßige Schicht auf einen geeigneten Träger aus natürlichem oder synthetischem Material aufgetragen.

Arzneistoffe können gelöst (Lösungssalben) oder suspendiert (Suspensionssalben) in der Zubereitung vorliegen. Das Bestreben eines Wirkstoffs, sein Vehikel zu verlassen, kann mit Hilfe der thermodynamischen Aktivität ausgedrückt werden. Die thermodynamische Aktivität stellt das Verhältnis der Wirkstoffkonzentration (c_v) zu dessen Sättigungslöslichkeit (c_s) in der Grundlage dar. Beim Erreichen der Sättigungslöslichkeit im Vehikel wird die maximale thermodynamische Aktivität erreicht. Deshalb soll die Freigabe aus den Suspensionszubereitungen theoretisch unverändert bleiben, solange die Wirkstoffkonzentration oberhalb der Sättigungslöslichkeit liegt. Bei Lösungssalben nimmt daher die thermodynamische Aktivität mit steigender Applikationsdauer ab. Um einen maximalen Transport mit möglichst niedriger Wirkstoffmenge zu erreichen, soll die Wirkstoffkonzentration in der Grundlage niedrig sein, aber gleichzeitig leicht über der Sättigungslöslichkeit liegen [Malzfeldt et al. 1989]. Solche eine Zubereitung wird durch einen hohen Wirkstoffverteilungskoeffizienten zwischen Stratum corneum und Vehikel charakterisiert. Suspensionssalben zeigen somit eine niedrigere Affinität zwischen Vehikel und Wirkstoff im Vergleich zu Lösungssalben [Malzfeldt et al. 1989].

Wegen der großen Vielfalt an verschiedenen streichfähigen Zubereitungen, gestaltet sich die Auswahl einer richtigen Grundlage meist schwierig. Zusätzlich besitzen wirkstofffreie halbfeste Darreichungsformen im Gegensatz zu anderen Arzneiformen möglicherweise eine Eigenwirkung. Deshalb müssen bei der Wahl des Trägermediums außer der physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs auch dermatologische Aspekte, wie die Art des Applikationsorts, Art und Stadium einer Krankheit, der Hauttyp und die natürliche Beschaffenheit der Haut, beachtet werden [Voigt 1995].

Die Zusammensetzung der Formulierung hat einen wesentlichen Einfluss auf den Wassergehalt der Haut und somit auf den Wirkstofftransport durch die Haut. Durch Auftragen der halbfesten Formulierung kann die Hydratation der Haut steigen, was ausführlicher in Kapitel 2.3.1 beschrieben wird. Wenn die Grundlage andererseits hygroskopische Hilfsstoffe wie Glycerol enthält, kann der Haut Feuchtigkeit entzogen werden [Voigt 1995]. Die Wirkstoffaufnahme kann auch durch Zugabe von Sorptionsvermittlern in die halbfeste Darreichungsform beeinflusst werden (siehe Kapitel 2.3.1 und 6). Zudem kann die Diffusion

der aktiven Substanz in der Zubereitung und somit ihre Freisetzung aus der Grundlage durch die Viskosität der Grundlage beeinflusst werden. Daneben ist die Polarität der Grundlage ebenfalls als Faktor zu nennen, wenn es darum geht das Verteilungs- und Diffusionsverhalten des Wirkstoffs zu variieren. Neben diesen Faktoren spielen die Benetzung der Haut durch das Vehikel und dessen Spreitung auf der Haut eine bedeutende Rolle bei der Wirkstoffaufnahme in die Haut. Der pH-Wert der Grundlage soll zwischen 4 und 10 liegen, um keine Irritation der Haut zu verursachen [Bucher et al. 1978, Murahata et al. 1988].

2.3.1. Optimierung halbfester Zubereitungen bezüglich der Transportrate

Die Barriereigenschaften der Hornschicht für den Substanztransport resultieren vor allem aus ihrem komplexen Aufbau und dem geringen Wassergehalt von 5-15% [Voigt 1995, WHO 2006]. Falls ein Wirkstoff nur eine geringe Neigung aufweist, aus einer halbfesten Formulierung in die Haut überzugehen, muss deren Zusammensetzung so geändert werden, dass die gewünschte dermale Verfügbarkeit erreicht wird. Dies kann beispielsweise durch Erhöhung der Sättigungslöslichkeit des Wirkstoffs oder durch Übersättigung in der Zubereitung erlangt werden, was zur Zunahme des Wirkstoffkonzentrationsgradienten und nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz zur Erhöhung der Penetrationsgeschwindigkeit führt [Walker und Smith 1996]. Eine weitere Maßnahme, um die Penetration der meisten Substanzen zu verbessern, ist es den Hydratationsgrad der Hornschicht zu erhöhen, was zu einer Lockerung der kompakten Struktur des Stratum corneum führt [Daniels 2004]. Der Hydratationsanstieg in der Hornschicht kann entweder durch das Auftragen einer Zubereitung, die die transepidermale Wasserabgabe behindert oder die selbst Wasser abgeben kann, erreicht werden. Eine weitere Alternative für die Grundlagenoptimierung stellt der Zusatz von Permeationsverbesserern in der Formulierung dar, die die Barrierefunktion des Stratum corneum reversibel verändern, reduzieren oder die Sättigungslöslichkeit im Stratum corneum erhöhen können [Daniels 2004, Barry 2001, Foldvari 2000, Walker und Smith 1996]. Ein Absorptionsbeschleuniger wird als ein Stoff definiert, der befähigt ist, den Widerstand der Hornschicht gegenüber der Passage von Wirkstoffen herabzusetzen und deren Hautpermeation zu erleichtern [Voigt 1995].

Die Erhöhung des transdermalen Fluxes kann gemäß der Gleichung 2.5 im allgemeinen durch die Löslichkeitserhöhung im Vehikel und/oder durch die Erhöhung der Permeationsgeschwindigkeit des Wirkstoffes erfolgen. Die Steigerung des apparenten Permeationskoeffizienten kann entweder durch die Erhöhung des Diffusionskoeffizienten der aktiven Substanz im Stratum corneum oder durch die Erhöhung der Wirkstoffsättigungslöslichkeit in der Hornschicht verursacht werden.

Die Transportbeschleuniger können somit die lokale oder transdermale Bioverfügbarkeit der aktiven Substanz über zwei verschiedene Mechanismen verbessern. Einerseits können die Enhancer die Wirkstofflöslichkeit in der Formulierung und dadurch auch den Konzentrationsgradient erhöhen. Diese Wirkung wird in der Literatur als „push effect“ bezeichnet [Kadir et al. 1987]. Der zweite Effekt, bekannt als „pull effect“, basiert auf der Beschleunigung des Wirkstofftransports in oder durch die Haut auf Grund einer verminderten Barriereeigenschaft der Haut [Kadir et al. 1987].

Die Mechanismen der Wirkstoffkonzentrationserhöhung in den Hautschichten sind für die verschiedenen Penetrationsbeschleuniger sehr unterschiedlich und nur teilweise bekannt [Barry 1987]. Die gleiche Substanz kann für unterschiedliche Wirkstoffe einen penetrationsfördernden oder retardierenden Effekt verursachen [Kogan und Garti 2006]. Die aktuellsten Studien auf diesem Gebiet beschäftigen sich mit der Vorhersage der Permeationserhöhung einer Substanz auf Grund der chemischen Struktur und physikochemischen Eigenschaften der Transportbeschleuniger mittels quantitativer Struktur-Absorptionsbeziehungen (QSARs) [Ghafourian et al. 2004]. Die Zugabe eines Penetrationsenhancers zur Zubereitung kann, ohne in die Struktur des Stratum corneums einzugreifen, die Löslichkeit des gelösten Wirkstoffs und dadurch auch seine thermodynamische Aktivität ändern, was gleichzeitig zur Änderung des Verteilungskoeffizienten Haut/Vehikel führt [Mura et al. 2000]. Die Reduzierung der Hautbarriereeigenschaften geschieht meistens durch Interkalation zwischen die Lipidketten der Bilayer oder durch Wechselwirkungen mit den polaren Kopfgruppen bzw. Denaturierung der Keratinfibrillen [Krause 2001, Barry 1987]. Die Wirkstoffaufnahme kann ebenfalls durch die Eigenpenetration des Penetrationsverbesserers beeinflusst werden, was zu einem veränderten Verteilungsverhalten der Substanz in den Hautschichten führt. Ein anderer Effekt, den die Penetrationenhancer verursachen können, ist die Veränderung des Hydratationszustands der Haut [Walker und Smith 1996]. Barry schlägt eine einfache Klassifizierung der Transportbeschleuniger anhand der Lipid-Protein-Verteilungs-Theorie vor [Barry 2001]. Gemäß dieser Hypothese können die Enhancer einen oder Kombination von mehreren grundsätzlichen Hauptmechanismen nützen. Diese sind die Wirkung auf die Lipide des Stratum corneum, eine Proteinmodifikation und eine Erhöhung der Verteilung in der Hornschicht.

3. Untersuchung der Prüfverfahren zur präklinischen Entwicklung halbfester Darreichungsformen

Der Einfluss unterschiedlicher Vehikel auf den Wirkstofftransport durch die Haut soll unter Berücksichtigung der Wirkstoffeigenschaften untersucht werden. Dies soll helfen, die Wechselwirkungen zwischen dem Wirkstoff, der Haut und der Grundlage zu verstehen und resultiert in einer Erstellung eines optimierten Ablaufschemas für die präklinische Entwicklung von halbfesten Zubereitungen. Die Untersuchung mit den dazu notwendigen Verfahren ist in ein mehrstufiges Arbeitsprogramm gegliedert. Diese Untersuchung soll anhand des aus rationalen Überlegungen am Anfang der Arbeit vorgeschlagenen Ablaufschemas erfolgen, das in Abb. 3.1 dargestellt ist.

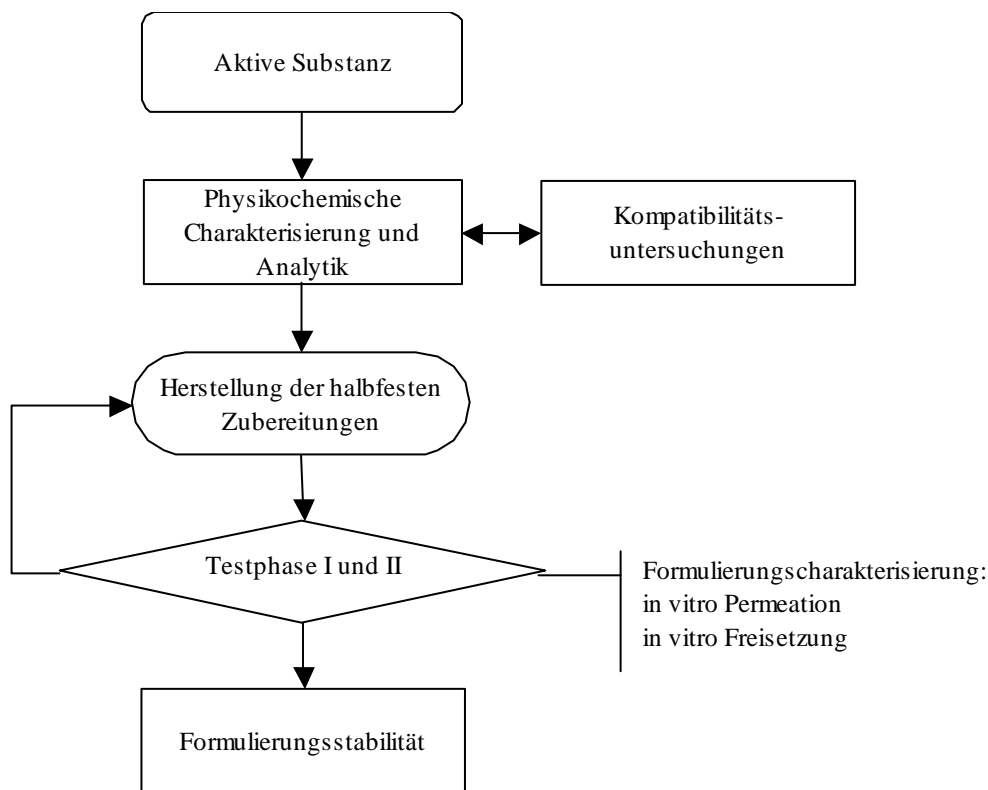


Abb. 3.1: Allgemeines Ablaufschema zur Herstellung halbfester Zubereitungen

In Betracht gezogen werden besonders Prüfverfahren, die wichtige Einflussgrößen oder Qualitätsmerkmale beschreiben, sowie in vitro Verfahren und Methoden, die ein hohes Potential zur Miniaturisierung und einen hohen Durchsatz aufweisen. In folgenden Kapiteln 4-10 wird auf die detaillierte Beschreibung und die Theorie der einzelnen Messmethoden eingegangen.

Die Arbeit soll mit einer ausführlichen physikochemischen Charakterisierung der ausgewählten Wirkstoffe beginnen, gefolgt von deren Einarbeitung und Charakterisierung in unterschiedliche halbfeste Darreichungsformen.

3.1. Wirkstoffe

Die Zielsetzung dieser Arbeit erfordert eine Reihe von Modellwirkstoffen, die ein möglichst breites Lipophilie- und Molmassen-Spektrum abdecken und die bereits Anwendung als topisch applizierte Substanzen haben. Dies erleichtert einen Vergleich und eine Bewertung mit den vorhandenen Literaturdaten.

3.1.1. Physikochemische Charakterisierung der Modellsubstanzen

Um Wirkstoffeinflüsse auf die Verteilung, Freisetzung und Hautpenetration von Arzneizubereitungen zu untersuchen, müssen zuerst die physikochemischen Eigenschaften eines Wirkstoffs bestimmt werden. Dies setzt u.a. validierte analytische Methoden für eine Quantifizierung voraus. Auf die wichtigsten Eigenschaften eines Wirkstoffs, die die kutane Resorption und Produktqualität beeinflussen, wurde bereits im Kapitel 2.2 eingegangen. Zur Charakterisierung der Modellsubstanzen wurden darüber hinaus die Löslichkeit, der Schmelzpunkt, zwei verschiedene Lipophilieparameter ($\log P$ und K_{IAM}), die Proteinbindung und Stabilität herangezogen. Die Löslichkeit der aktiven Substanz ist ein wichtiger Parameter bei der Entwicklung von halbfesten Formulierungen und bei der Durchführung der biopharmazeutischen Untersuchungen zur Permeation und Freisetzung. Die Kenntnis der Löslichkeit des Wirkstoffs ist ebenfalls von großer Bedeutung bei der Evaluierung von dessen Distributions-, Metabolismus- und Toxizitäts-Profil [Ikeda et al. 2005]. Der Schmelzpunkt einer Substanz ist ein Surrogat-Parameter und ist mit ihrer Löslichkeit und der Ausbildung von Wechselwirkungen verbunden. Der Oktanol/Wasser- Verteilungskoeffizient wurde in den letzten Dekaden als Standardparameter für die Lipophilie in den quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSARs) und in der Wirkstoffcharakterisierung verwendet [Salminen et al. 1997]. Er soll auf Grund der Vergleichbarkeit der Lipophilie von Oktanol zu den Membranlipiden die Wirkstoffinteraktionen mit biologischen Membranen simulieren. Der optimale $\log P$ -Wert für die Wirkstoffaufnahme in die Haut sollte zwischen -1 und +4 liegen [Sanco 2004]. In den letzten Jahren haben auch andere alternative Parameter zur Studie der Wirkstoff/Membranen-Interaktionen an Interesse gewonnen. Zu diesen gehört unter anderem der Retentionsfaktor auf einer mit Phosphatidylcholin funktionalisierten HPLC-Säule, der K_{IAM} -Wert. Der große Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Phospholipide höhere strukturelle Ähnlichkeit mit den Zellmembranen aufweisen. Da Wirkstoffe an Hautproteine

gebunden werden können, was zu einer weitgehenden Wirkstoffinaktivierung führt, ist die Vorhersage ihrer Proteinbindung von großer Bedeutung. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Prüfpunkt bei der Entwicklung halbfester Darreichungsformen ist das Stabilitätsprofil der Wirksubstanz.

3.1.2. Vorhersage der Permeationsgeschwindigkeit der Modellsubstanzen anhand zwei kommerzieller in silico Modelle

In vielen Fällen kann man anhand der experimentell bestimmten physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes sein pharmakokinetisches Verhalten vorhersagen. Auf dem Gebiet des transdermalen Wirkstofftransports gibt es seit längerer Zeit Bestrebungen, solche Faktoren, die einerseits den Transport beeinflussen und andererseits Vorhersagen über die Wirkstoffdiffusion erlauben, zu definieren. Die in silico Modelle stellen Korrelationen zwischen solchen Faktoren und den experimentell ermittelten Permeationsgeschwindigkeiten für die bereits untersuchten Wirkstoffe dar und ermöglichen somit eine Vorhersage der Permeation einer neuen Substanz. Zu den typischen Deskriptoren in den in silico Modellen gehören: die Molmasse, das Molekularvolumen, der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient und der Schmelzpunkt [Moss et al. 2002, Magnusson et al. 2004].

3.2. Grundlagen und deren Charakterisierung

Bei dermalen Anwendung ist die Wirkstoffwirkung in großem Ausmaß vom Vehikel abhängig, in das er inkorporiert ist. Deshalb kommt der Auswahl der geeigneten Grundlage eine bedeutsame Rolle zu. Hier muss an erster Stelle die Kompatibilität der aktiven Substanz mit den verwendeten Hilfsstoffen geprüft werden. Auf Grund der physikochemischen Eigenschaften der Wirkstoffe soll die Auswahl der Grundlagen getroffen werden. Als Grundlagen werden drei übliche, offizinelle Zubereitungen ausgewählt, die sich stark in ihrer Polarität unterscheiden. Die Grundlagencharakterisierung umfasst die Dichte, Viskosität, Spreitbarkeit und Konsistenz der Grundlage, sowie den pH-Wert des Vehikels.

Auf diesem Schritt aufbauend wird geprüft, inwieweit die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs und der Grundlage den Wirkstofftransport über die Haut beeinflussen.

3.3. Formulierungen und deren Charakterisierung

3.3.1. Physikochemische Formulierungscharakterisierung

Die Formulierungscharakterisierung umfasst mikroskopische Aufnahmen, die Bestimmung des Wirkstoffgehalts in der Zubereitung sowie Stabilitätsuntersuchungen. Eine frühzeitige

Bewertung der Stabilität halbfester Zubereitungen kann entscheidend Zeit und Kosten einsparen. Die Informationen über Formulierungsstabilität wurden deswegen mittels eines beschleunigten Haltbarkeitstests gewonnen.

3.3.2. Biopharmazeutische Formulierungscharakterisierung (Testphase I)

Die Verfahren und Methoden für die Testung von APIs/ACIs aus halbfesten Grundlagen hinsichtlich der Freisetzung aus der Grundlage und der Aufnahme in die Haut wurden definiert und bewertet. Deswegen erfolgten für alle ausgewählten Testsubstanzen, die in die drei ausgewählten Grundlagen inkorporiert werden, in vitro Versuche, wobei als Hautmembran vor allem exzidierte Humanhaut und biotechnologisch hergestellte kommerziell verfügbare humane Hautmodelle eingesetzt wurden. Dabei sollten die Beschaffenheit der Haut und deren Einfluss auf die Wirkstoffpermeation geprüft werden. Hierzu wurde das am weitesten verbreitete und akzeptierte in vitro Testsystem zur Untersuchung der Permeation, die Franz Diffusionszelle, verwendet. Die in vitro Permeationsversuche sollten Informationen liefern, in welcher Menge und wie schnell die aktive Substanz durch die Haut transportiert wird. Des weiteren war die in vitro Freisetzung aus den halbfesten Formulierungen zu untersuchen.

3.4. Optimierung der halbfesten Zubereitungen (Testphase II)

Nach einer ersten Versuchsreihe wurden Formulierungen zur Modellierung der Resorption modifiziert. Die Haut hat eine stark ausgeprägte Barrierefunktion und es ist daher häufig notwendig, geeignete Strategien zu entwickeln, um den gewünschten Wirkstofftransport aus dermal angewandten Produkten zu erreichen. Die pharmazeutische Vehikeloptimierung führt dazu, dass eine Formulierung bei gleicher Wirkstoffkonzentration hinsichtlich des Wirkstofftransports deutlich verbessert werden kann. Dies sollte durch den Zusatz von permeationsfördernden Substanzen, deren Effekte darauf beruhen, dass sie eine gute Spreitbarkeit auf und in der Haut haben, sowie eine hohe Affinität zur Haut besitzen, erreicht werden. Ferner haben die transportfördernden Hilfsstoffe die Aufgabe, in die Haut einzudringen ohne systemisch zu wirken, den Wirkstoff gut zu lösen und ihn ausreichend tief in die Haut zu bringen. Nach der Auswahl transportfördernder Hilfsstoffe wurde deren Kompatibilität mit den Modellsubstanzen untersucht. Anschließend wurden permeationsfördernde Substanzen in die Grundlagen eingearbeitet und das in vitro Verhalten nach der Applikation auf die Haut untersucht.

4. Modellsubstanzen und deren Charakterisierung

4.1. Modellsubstanzen

Bei der Auswahl der Testsubstanzen dieser Arbeit wurden zwei Hauptkriterien definiert. Primär sollten sich die ausgewählten Stoffe in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden, wobei das Hauptgewicht auf die Parameter Lipophilie und Molmasse gelegt wurde. Zweites Kriterium war eine möglichst homogene Substanzgruppe zu haben, die kosmetisch oder dermatologisch gebräuchlich sein sollte.

Als geeignete Wirkstoffgruppe wurden die Glucocorticoide identifiziert. Aus einer Vorauswahl von 20 Substanzen (siehe Anhang 1) wurden schließlich sechs Wirkstoffe als Testsubstanzen ausgewählt (Tab. 4.1). Vier Modellsubstanzen entstammten davon der Gruppe der Corticosteroiden. Zu diesen gehören: Hydrocortison, Mometasonfuroat, Clobetasolpropionat und Betamethasonvalerat.

Corticosteroide werden in der Rinde der Nebennieren unter dem Einfluss des adrenocorticotropen Hormons gebildet [Roth und Henner 2000]. Je nach Wirkung unterscheidet man Mineralcorticoide und Glucocorticoide. Erstere regulieren den Mineralstoffwechsel und Wasserhaushalt des Organismus. Letztere steuern den Kohlenhydrat- und Zuckerstoffwechsel, stimulieren die Glucogenase und erhöhen dadurch den Blutzuckerspiegel. Die Glucocorticoide sind vor allem wegen ihrer antiinflammatorischen, antiallergischen, antirheumatischen und immunsuppressiven Wirkung von großer Bedeutung. In der Dermatologie sind lokal wirksame Corticoide bei der Behandlung von entzündlichen Hautkrankheiten unentbehrlich. Sie wirken schnell und unterdrücken die Entzündungszeichen und immunologischen Prozesse effektiv. Langfristig können sie jedoch unerwünschte Nebenwirkungen verursachen: die Haut wird dünner und elastische Fasern unter der Haut werden irreversibel zerstört. Diese unerwünschten Wirkungen lassen sich durch gezielte Dosierung und gezielte chemische Modifikation zurückdrängen. Eine Leitliniengruppe der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft hat einen Therapeutischen Index (TIX) für topische Corticosteroide erarbeitet. Dieser Index ist der Quotient aus der Summe der Wirkungen, durch die Summe der Nebenwirkungen. Bei den neueren topischen Steroiden treten im Gegensatz zu älteren Substanzen Nebenwirkungen wie Hautatrophie oder auch systemische Nebenwirkungen seltener auf. Bei dieser Bewertung schneiden von den neuen Corticosteroiden Mometasonfuroat und Methylprednisolonaceponat

am besten ab. Die Behandlung mit topischen Glucocorticoiden ist heutzutage also erheblich risikoärmer als früher.

Mittlerweile unterscheidet man vier Generationen von Corticoiden. Zur ersten Generation gehören unter anderem Hydrocortison und Prednisolon. Die Verbindungen sind nicht halogeniert und verfügen über keine Doppelester. Bei den Corticoiden der zweiten Generation ist eine einfache Halogenierung (meist Fluorierung) in Position C-6 oder C-9 anzutreffen. Beispiele sind Mometason und Betamethason. Die Verbindungen der dritten Generation zeichnen sich durch doppelte Halogenierung in C-6 und C-9 aus. Als Beispiele seien hier Fluticason und Fluocinolon genannt. Die Corticoide der letzten Generation wie Prednicarbat und Hydrocortisonaceponat weisen keine Halogenierung mehr auf. Dafür besitzen sie eine Doppelesterfunktion in Position C-17 und C-21. Durch die zweifache Veresterung steigt die Lipophilie der Verbindungen. In der Haut vorhandene Esterasen spalten den Ester am C-21 und überführen das Corticoid in die wirksame Form. Die Corticoide dieser Generation zeichnen sich durch gute antiinflammatorische und geringe antiproliferative Wirkung aus. Die Unterteilung der topischen Glucocorticoide nach den Wirksamkeitsklassen ist im Anhang 2 dargestellt.

Die beiden zusätzlich zu den Corticosteroide einbezogenen Wirkstoffe (Koffein und Testosteron) wurden auf Grund einer sehr guten Datenlage bezüglich ihrer in vitro Permeation [Netzlauff et al. 2006, Asbill et al. 2000, Bonina et al. 1993, Van de Sandt et al. 2004, Schäfer-Korting et al. 2006, Dias et al. 1999, Schreiber et al. 2005, Monti et al. 2001, Bock et al. 2002] und um die Bandbreite der physikochemischen Eigenschaften von Modellsubstanzen zu erweitern, ausgewählt. Diese beiden Testsubstanzen gehören darüber hinaus zu den empfohlenen Standards der OECD-Guideline [OECD 2004]. Koffein wird bei den topischen kosmetischen Produkten als ACI wegen seiner stimulierenden Aktivität beim Fettmetabolismus eingesetzt [Bertin et al. 2001]. Testosteron findet seine Hauptanwendung in der Hormonersatztherapie. Dank der umfangreichen Daten und Ergebnisse aus Versuchen mit Koffein und Testosteron können die beiden Substanzen wichtige Informationen über die Hautintegrität liefern und eine gewisse Standardisierung des Verfahrens sichern. Diese beiden Substanzen werden daher zur Qualitätskontrolle und als Referenzsubstanzen bei allen Untersuchungen ausgewählter Steroide parallel mitgeführt.

Tab. 4.1: Ausgewählte Modellsubstanzen

Substanz	CAS-Nr.	Strukturformel	Molmasse [g/mol]	Strukturformel
Betamethasonvalerat	2152-44-5	$C_{27}H_{37}FO_6$	476,59	
Clobetasolpropionat	25122-46-7	$C_{25}H_{32}ClFO_5$	466,98	
Hydrocortison	50-23-7	$C_{21}H_{30}O_5$	362,47	
Mometasonfuroat	83919-23-7	$C_{27}H_{30}Cl_2O_6$	521,44	
Testosteron	58-22-0	$C_{19}H_{28}O_2$	288,43	
Koffein	58-08-2	$C_8H_{10}N_4O_2$	194,19	

Die REM-Bilder der Testsubstanzen sind in Abb. 4.1 präsentiert.

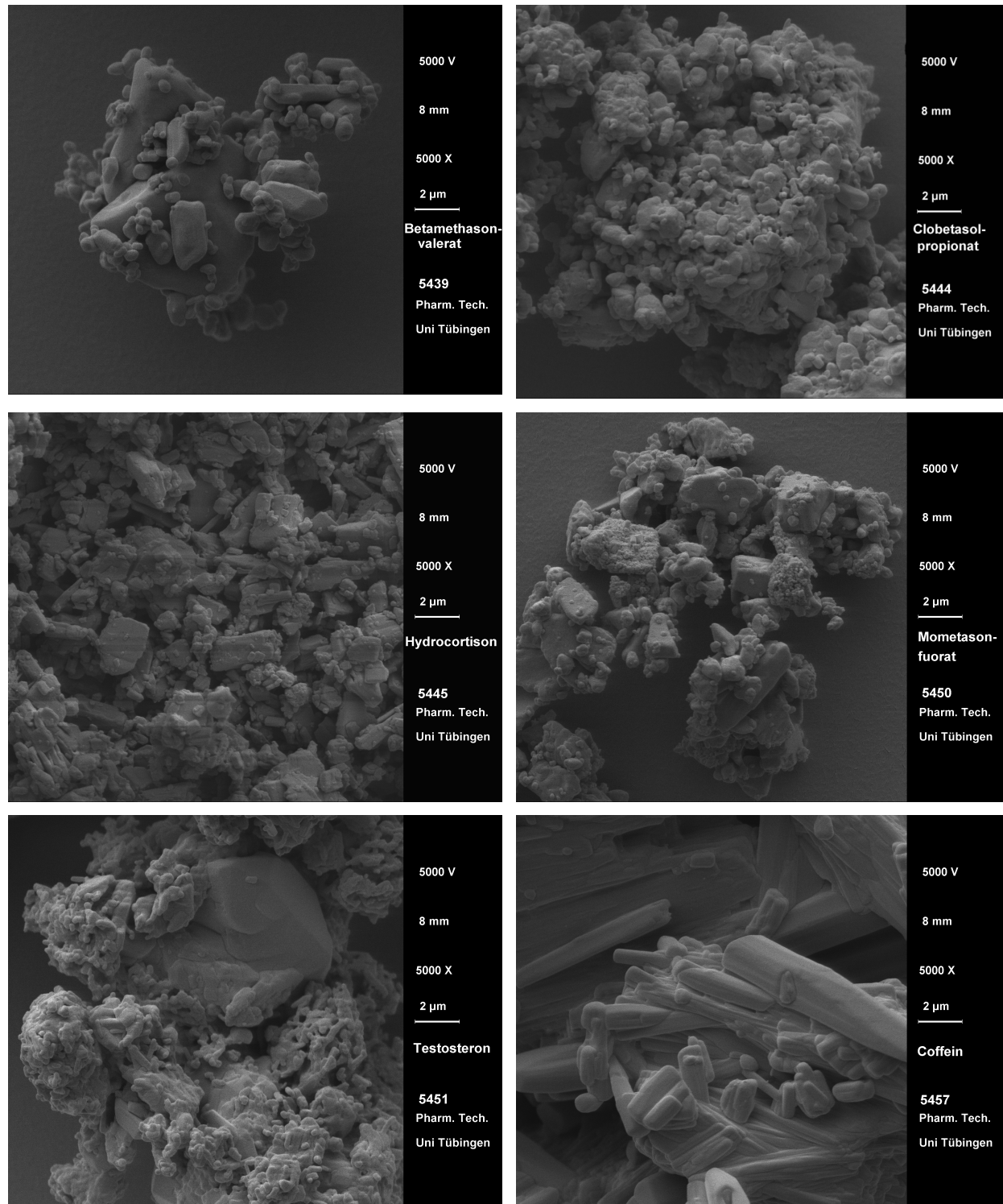


Abb. 4.1: REM-Bilder der Testsubstanzen

In Abb. 4.2 sind die Modellsubstanzen in Abhängigkeit von der Molmasse angeordnet.

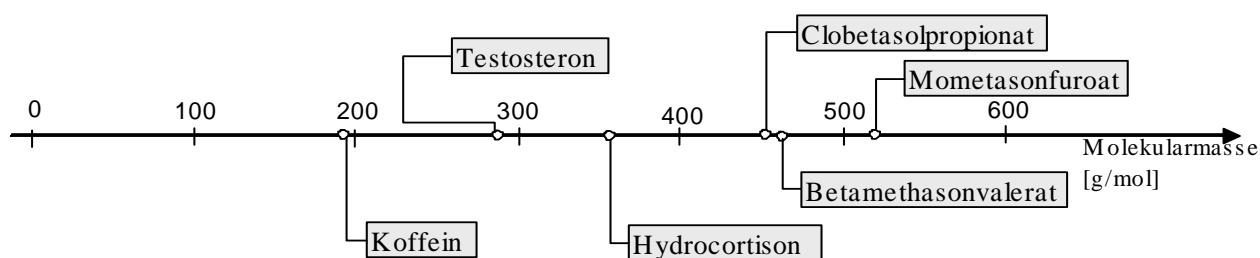


Abb. 4.2: Verteilung der Substanzen auf der Molmasse-Achse

In Bezug auf ihre Lipophilie (nach Literaturangaben) können zwei Hauptgruppen unterschieden werden:

- Substanzen mit niedriger Lipophilie (bis $\log P \leq 2$): Koffein und Hydrocortison;
- Substanzen mit hoher Lipophilie ($\log P > 2$): Testosteron, Betamethasonvalerat, Clobetasolpropionat, Mometasonfuroat.

Die Verteilung der Testsubstanzen bezüglich ihrer Molmasse und ihrem Log P-Wert ist in der Abb. 4.3 zusammengefasst.

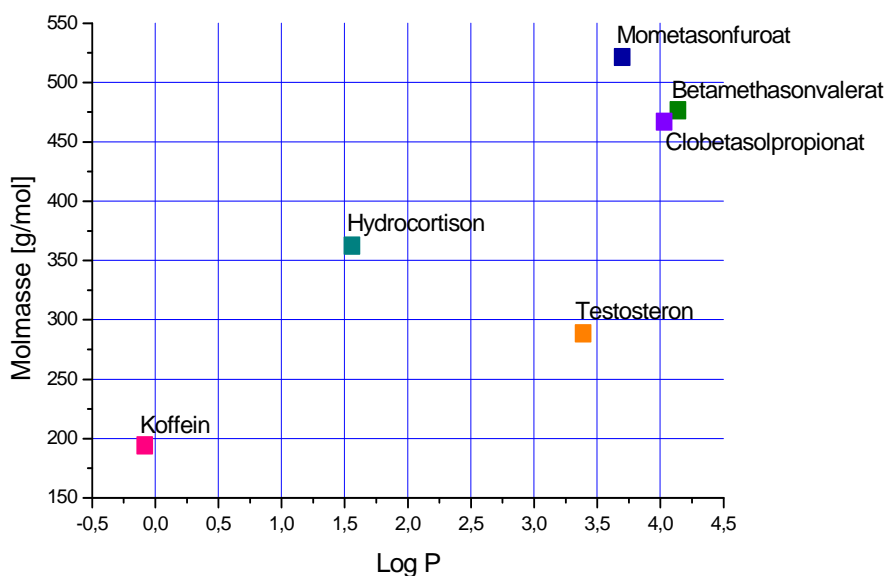


Abb. 4.3: Verteilung der Testsubstanzen nach der Molmasse und dem Log P-Wert

Im Rahmen dieser Arbeit wurden APIs bzw. ACIs ausgewählt, von denen bereits halb feste Zubereitungen auf dem Markt existieren. An dieser Stelle soll deshalb darauf hingewiesen werden, dass die hier beschriebene Vorgehensweise auch auf neue Wirkstoffkandidaten übertragbar sein soll.

4.2. Physikochemische Charakterisierung der Modellsubstanzen

Nach der Substanzauswahl wurden die Wirkstoffe näher charakterisiert, da die Beurteilung der physikochemischen Eigenschaften wichtige Informationen für die spätere Formulierungsarbeit liefert. Die für die Transportversuche und Entwicklung halbfester Zubereitungen wichtigsten physikochemischen Eigenschaften der ausgewählten Wirkstoffe wurden bestimmt. Entsprechende physikochemische Kennzahlen des Wirkstoffs, wie Molmasse, Log P, pKa, Angaben zur Löslichkeit und Stabilität, werden in den Richtlinien vom Wissenschaftlichen Komitee für Verbraucherprodukte (SCCP) zur Bewertung von in vitro Untersuchung zur dermalen Absorption verlangt [SCCNFP 2003, SCCP 2006]. Von Interesse waren in erster Linie Methoden, die die Ergebnisse sicher und schnell liefern können und dabei mit wenig Wirkstoff (< 100 mg) auskommen.

Ferner ist die Kenntnis der Sättigungslöslichkeit jedes Wirkstoffs im Akzeptormedium und in der Zubereitung selbst unerlässlich. In einem ersten Schritt erfolgte die Löslichkeitsabschätzung mit einer nephelometrischen Methode. Die Sättigungslöslichkeit der Modellsubstanzen in den für die Permeationsversuche vorgesehenen Akzeptormedien wurde mittels Shake Flask-Methode charakterisiert. Diese Werte sind für die Durchführung der in vitro Permeationsversuche notwendig, um Sink-Bedingungen und somit eine freie Diffusion der Substanz während des Versuchs zu sichern. Nach Vorgaben der SCCP sollte der gelöst im Akzeptor vorliegende Wirkstoff 10% der Sättigungskonzentration nicht überschreiten [SCCP 2006]. Löslichkeitsangaben werden zudem zur Vorhersage des Zustands benötigt, in welchem die Wirkstoffe in der Grundlage vorliegen. Abschließend wurden die Schmelzpunkte der Modellsubstanzen bestimmt, da dieser Wert in Zusammenhang mit der Löslichkeit steht.

Grundlegende Bedeutung für die Löslichkeit von Substanzen und für das Verhalten eines Wirkstoffs im menschlichen Körper haben die Log P- und pKa-Werte. Sie stellen daher physikochemische Standardgrößen dar. Der pKa-Wert einer Substanz definiert den Ionisierungsgrad, den ein Molekül in Abhängigkeit vom pH-Wert hat. Der pKa-Wert beeinflusst die Verteilung des Wirkstoffes in gelöster Form und die Verwendbarkeit des Wirkstoffes, um an physiologischen Vorgängen teilzunehmen. Die ausgewählten Modellsubstanzen weisen jedoch keine basische oder saure Funktionalität auf, weshalb eine Bestimmung dieses Wertes entfällt. Voraussetzung für die freie Diffusion durch Lipidmembranen ist eine gewisse Lipophilie der Substanz. Der Log P-Wert ist ein direktes Maß für die Lipophilie einer Verbindung. Dabei wird die Verteilung des Wirkstoffs in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen (z.B. Octanol/Wasser) bestimmt. Als Alternative zum Log P bietet sich der K_{IAM} -Wert an, der die Verteilung des Arzneistoffs zwischen einer

wässrigen Phase und Phospholipiden widerspiegelt. Diese Methode ist für schwer lösliche Substanzen geeignet und ist zudem schnell und einfach durchzuführen.

Eine weitere wichtige Stoffeigenschaft ist die Proteinbindung, da die meisten topisch applizierten Wirkstoffe bei ihrer Hautpassage zum Teil an Proteine gebunden werden. In Gegenwart von entzündlichen Prozessen kann die Bindung auch an Serumalbumine erfolgen, die durch geschädigte Gefäßwände in der Dermis diffundiert sind.

Zu letzt werden die intrinsischen Stabilitätseigenschaften der Testsubstanzen bestimmt, um entsprechende Maßnahmen bei der Entwicklung halbfester Formulierungen vornehmen zu können, wie zum Beispiel die Zugabe von Antioxidanzien zu Zubereitung mit oxidationsempfindlichen Wirkstoffen.

Die obengenannten Parameter werden auch deshalb untersucht, um die Vorhersagbarkeit des Permeationsverhaltens anhand bestimmter physikochemischer Eigenschaften der Substanz zu überprüfen, was näher in Kapitel 4.3 beschrieben wurde.

4.2.1. Nephelometrische Löslichkeitsbestimmung

Orientierende Werte zur Löslichkeit der ausgewählten Wirkstoffe wurden mit einer nephelometrischen Methode ermittelt (siehe Kapitel 10.2.1). Diese Methode bietet sich besonders für neue Wirkstoffkandidaten an, da nur geringste Mengen an Testsubstanz benötigt werden. Gleichzeitig lässt sich mit dieser Methode die Löslichkeitsklasse der zu untersuchenden Substanz schnell und einfach bestimmen [Bevan und Lloyd 2000, Kerns 2001].

Die nephelometrische Methode kann eingesetzt werden, wenn die Löslichkeit des Wirkstoffs 1% nicht deutlich überschreitet (für praktisch unlösliche, sehr schwer lösliche und zum Teil schwer lösliche Substanzen nach den Arzneibuchklassen). Die Löslichkeitsklassen nach USP, Martindale und Europäischem Arzneibuch sind in Tab. 4.2 dargestellt [Martindale 1996, Ph. Eur. 2005, USP 2006].

Tab. 4.2: Löslichkeitsklassen nach USP, Martindale und Ph. Eur. in Wasser bei 15-25 °C

Bezeichnung	Löslichkeit [g/L]
sehr leicht löslich (very soluble)	> 1000
leicht löslich (freely soluble)	100-1000
löslich (soluble)	33-100
wenig löslich (sparingly soluble)	10-33
schwer löslich (slightly soluble)	1-10
sehr schwer löslich (very slightly soluble)	0,1-1
praktisch unlöslich (practically insoluble)	< 0,1

Die Ergebnisse der nephelometrischen Löslichkeitsbestimmungen sind in Tab. 4.3 aufgelistet und entsprechenden Literaturangaben gegenübergestellt.

Tab. 4.3: Messwerte der nephelometrischen Löslichkeitsbestimmung

Wirkstoff	Gemessene Löslichkeit [g/L]		Literaturangaben
Betamethasonvalerat	> 0,022	< 0,067	praktisch unlöslich [USP 2006]
Clobetasolpropionat	> 0,007	< 0,022	praktisch unlöslich [USP 2006]
Hydrocortison	> 0,334	< 1,003	praktisch unlöslich [Ph. Eur. 2005] schwer löslich [USP 2006]
Mometasonfuroat	> 0,002	< 0,007	praktisch unlöslich [Ph. Eur. 2005]
Testosteron	> 0,022	< 0,067	praktisch unlöslich [Ph. Eur. 2005, USP 2006]
Koffein	> 0,503	-	wenig löslich [Ph. Eur. 2005, USP 2006]

Als Beispiel wird das Ergebnis der Messung für Testosteron in Abb. 4.4 dargestellt.

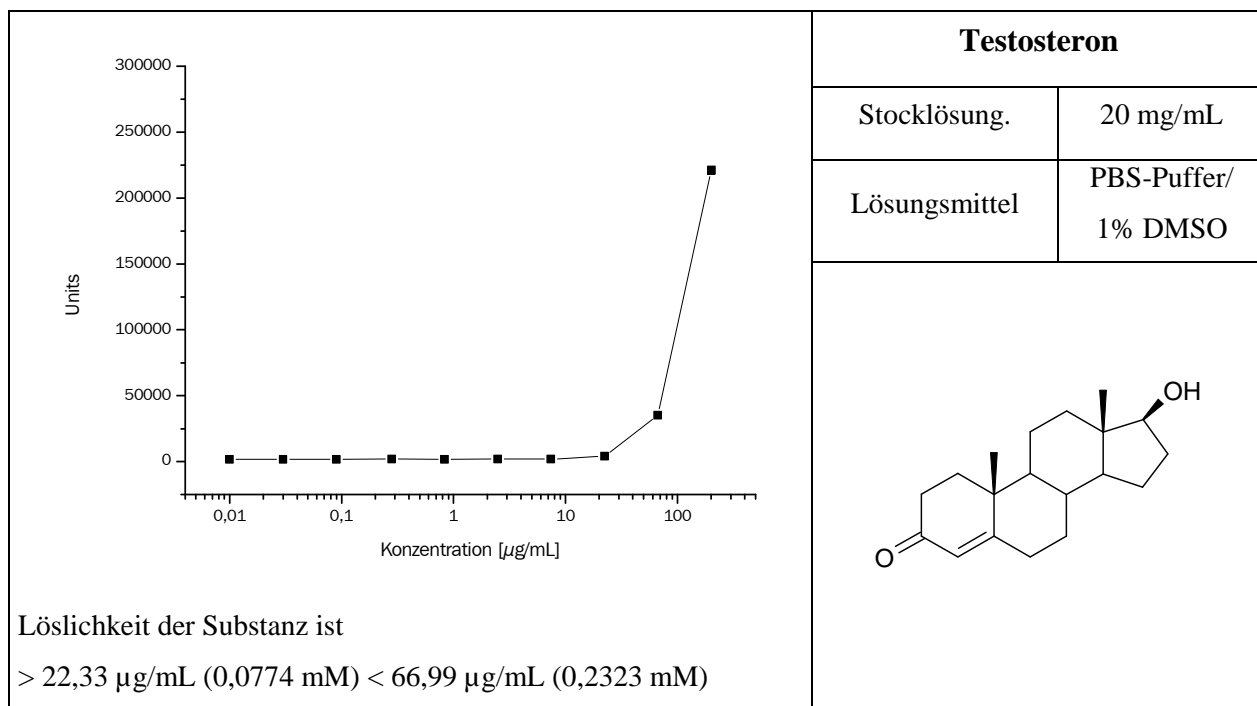


Abb. 4.4: Darstellung der nephelometrischen Löslichkeit von Testosteron

Betamethasonvalerat, Clobetasolpropionat, Mometasonfuroat und Testosteron gehören nach der Literaturangaben zu den praktisch unlöslichen Substanzen in Wasser [Ph. Eur. 2005, USP 2006]. Die eigenen Untersuchungen bestätigen diese Angaben der Literatur. Die gemessene Löslichkeit der Substanzen Betamethasonvalerat und Testosteron liegt in dem gleichen Konzentrationsbereich. Clobetasolpropionat zeigt eine etwas niedrigere Löslichkeit im Vergleich zu Betamethasonvalerat und Testosteron. Mometasonfuroat weist die niedrigste Löslichkeit von allen analysierten Steroiden auf.

Koffein war komplett löslich im gemessenen Konzentrationsbereich; in der Graphik war kein Anstieg feststellbar. Die gemessene Löslichkeit ist somit größer als 0,5 g/L (in PBS bei pH 7,4 und RT). Koffein gehört nach Literaturangaben zu den in Wasser wenig löslichen Substanzen [USP 2006]. Die nephelometrische Löslichkeitsbestimmung ist für solche Wirkstoffe ungeeignet. Mit dieser Methode kann nur festgestellt werden, dass Koffein im untersuchten Konzentrationsbereich löslich ist. Der genaue Löslichkeitsbereich kann in diesem Fall nicht nephelometrisch bestimmt werden.

Hydrocortison war in zwei (20 mg/mL und 40 mg/mL) gemessenen Konzentrationsbereichen löslich. Bei Hydrocortison wurde kein Ausfallen der Substanz aus der Stocklösung in PBS beobachtet. Wie beim Koffein, war kein Anstieg in der Graphik feststellbar. In der Literatur finden sich zwei verschiedene Angaben zur Löslichkeit von Hydrocortison. Nach dem Europäischen Arzneibuch gehört Hydrocortison zu den praktisch unlöslichen Substanzen in Wasser [Ph. Eur. 2005]. Gemäß USP befindet sich das Hydrocortison in der Gruppe der sehr schwer löslichen Wirkstoffe [USP 2006]. Die eigenen Ergebnisse deuten in Richtung der schwer löslichen Wirkstoffgruppe. Die gemessene Löslichkeit beträgt mehr als 0,334 g/L und weniger als 1,003 g/L (in PBS bei pH 7,4 und RT).

4.2.2. Sättigungslöslichkeit im Akzeptormedium

Die Sättigungslöslichkeit der Modellsubstanzen wurde in dem für die Permeationsversuche vorgesehen Akzeptormedium KRB bei pH 7,4 und bei 32 °C bestimmt (siehe Kapitel 10.2.2). Eine pH-Wert abhängige Löslichkeit der Substanzen ist nicht vorhanden, da alle Testsubstanzen weder saure oder basische Gruppen aufweisen. Die Ergebnisse sind somit auf weitere Puffermedien und auch andere pH-Werte übertragbar. Die Ergebnisse der Bestimmung der Sättigungslöslichkeit gibt Tab. 4.4 wieder. Die Werte stimmen mit den Ergebnissen aus der Nephelometrie überein. Koffein ist wie erwartet sehr gut löslich, Hydrocortison relativ gut löslich in KRB. Die Steroide sind dagegen im wässrigen Medium schlecht löslich. Mometasonfuroat ist praktisch unlöslich in Wasser. Die Konzentration lag offensichtlich unterhalb der Bestimmungsgrenze (LLOQ = 0,025 µg/mL). Wegen der mit der Ausnahme von Hydrocortison sehr schlechten Löslichkeit der Corticosteroide im KRB-Puffer, ist bei den Permeationsversuchen die Zugabe eines Lösevermittlers zum Akzeptor notwendig. Deshalb erfolgte in einem abschließenden Schritt die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit in KRB-Puffer mit Zusatz von 1% BSA. BSA wird durch die OECD-Guideline, SCCNFP und SCCP zum Einsatz in Permeationsstudien mit schwerlöslichen Substanzen empfohlen, um ihre Löslichkeit via Proteinbindung zu erhöhen [OECD 2004, SCCNFP 2003, SCCP 2006]. Gemäß der Erwartungen hat sich die Sättigungslöslichkeit von

Mometasonfuroat, Clobetasolpropionat, Betamethasonvalerat und Testosteron durch den BSA-Zusatz erhöht. Die Löslichkeit von Hydrocortison und Koffein blieb dagegen unverändert. Die Ergebnisse der beiden Bestimmungen sind in Tab. 4.4 aufgelistet.

Tab. 4.4: Sättigungslöslichkeit der Modellsubstanzen in den untersuchten Medien, n=3, Mittelwert \pm Standardfehler

Substanz	Löslichkeit [$\mu\text{g/mL}$]	
	in KRB	in KRB mit 1% BSA
	MW \pm SD	MW \pm SD
Betamethasonvalerat	12,97 \pm 0,23	25,57 \pm 0,20
Clobetasolpropionat	1,61 \pm 0,15	5,85 \pm 0,61
Hydrocortison	333,02 \pm 14,57	314,13 \pm 3,50
Mometasonfuroat	<0,01 (< LLOQ)	0,258 \pm 0,068
Testosteron	28,84 \pm 2,19	72,12 \pm 0,21
Koffein	24451,60 \pm 1263,21	21881,86 \pm 1157,06

4.2.3. Schmelzpunkte

In der Pharmazie wird die DSC zur Überprüfung der Reinheit und Identität von Substanzen, sowie zur Bestimmung von Wärmekapazität und Schmelzwärme eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die Schmelzpunkte zur physikochemischen Charakterisierung der Modellsubstanzen ermittelt [siehe Kapitel 10.3]. In Tab. 4.5 sind die gemessenen Schmelzpunkte aufgeführt und den Literaturwerten gegenübergestellt.

Tab. 4.5: Schmelzpunkte der Modellsubstanzen

Substanz	Gemessener Schmelzpunkt [$^{\circ}\text{C}$]	Literaturangaben [$^{\circ}\text{C}$]
Betamethasonvalerat	195,77	192 unter Zersetzung [Ph. Eur. 2005]
Clobetasolpropionat	197,69	195,5-197 [Merck Index 1983]
Hydrocortison	221,77	217-220 unter etwas Zersetzung [Merck Index 1983]
Mometasonfuroat	227,61	220 unter Zersetzung [USP 2006]
Testosteron	152,44	153-157 [USP 2006]
Koffein	235,78	234-239 [Merck Index 1983]

Die gemessenen Schmelzpunkte der Modellsubstanzen stimmten mit den Literaturangaben überein.

4.2.4. Indikatoren für die Membranpermeabilität

Verteilungskoeffizient Log P

Die Lipophilie gehört zu den wichtigsten physikochemischen Parametern zur Vorhersage und Interpretation der Wirkstoffpermeabilität durch biologische Membranen.

Die äußeren Partien der Haut fungieren als Lipoidmembranen. Voraussetzung für die freie Diffusion durch die Hautbarriere ist daher eine gewisse Lipophilie der Substanz. Je lipophiler eine Verbindung ist, um so mehr ist sie befähigt, lipophile Membranen zu durchdringen. Der Log P-Wert ist ein direktes Maß für die Lipophilie einer Verbindung. Er gibt Auskunft über die Verteilung einer Substanz in zwei nicht mischbaren, im Gleichgewicht befindlichen Phasen: einer lipophilen Phase und einer hydrophilen Phase. Octanol dient hier als Modelllipid für das Stratum corneum. Der optimale Log P-Wert einer Substanz für ihren Transport über die Haut liegt zwischen -1 und +4 [Sanco 2004].

Der Verteilungskoeffizient errechnet sich nach Gleichung 4.1

$$P = \frac{c_o}{c_w} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

P Verteilungskoeffizient

c_o Konzentration des Stoffs in der lipophilen Phase (Octanol)

c_w Konzentration des Stoffs in der hydrophilen Phase (KRB-Puffer)

Die Ergebnisse der Bestimmung sind in Tab. 4.6 aufgelistet und mit Literaturangaben verglichen. Abb. 4.5 stellt die gemessenen Log P-Werte graphisch dar.

Tab. 4.6: Gemessene Log P-Werte und Literaturwerte

Substanz	Log P	Log P (Literaturwert)
Betamethasonvalerat	4,14	3,6 [5]; 3,98 [7]
Clobetasolpropionat	4,03	4,3 [4]
Hydrocortison	1,56	1,5 [1]; 1,64 [5]; 1,7 [2]; 1,43 [7], 1,53 [8]
Mometasonfuorat	n. q.	3,7 [6]
Testosteron	3,39	3,23 [1]; 3,2 [2]; 3,48 [7], 3,31 [8]
Koffein	-0,08	-0,15 [1]; -0,057 [3]; -0,07 [5]; -0,08 [7]

[1] Bonina et al. 1993, [2] Faassen et al. 2003, [3] Testa et al. 2001, [4] Bilich et al. 2004, [5] Edetox Chemikaliendatenbank (www.ncl.ac.uk/edetox), [6] Internetangaben, [7] Magnusson et al. 2004, [8] Mitragotri 2003

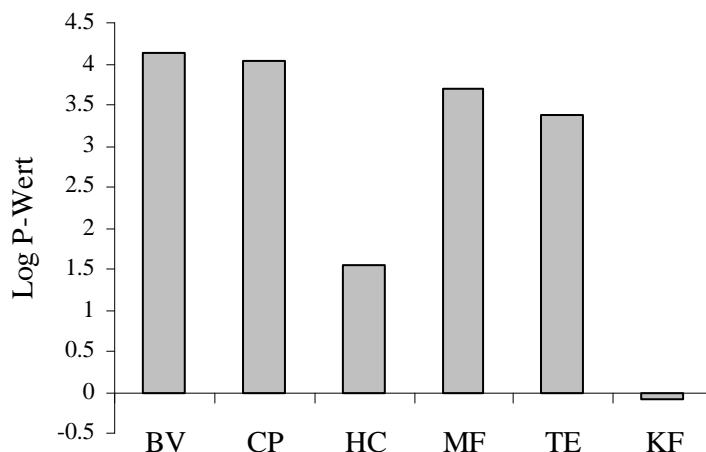


Abb. 4.5: Gemessene Log P-Werte, für Mometasonfuroat wurde der Literaturwert dargestellt

Die Steroide wiesen erwartungsgemäß hohe Log P-Werte auf. Die Log P-Werte lagen hier zwischen 1,56 für Hydrocortison und 4,14 für Betamethasonvalerat. Der gemessene Log P-Wert für das hydrophile Koffein lag bei -0,08.

Die ermittelten Werte stimmen weitgehend mit der Literatur überein, lediglich die Werte für Betamethasonvalerat und Clobetasolpropionat weichen leicht von den Literaturwerten ab.

Für Mometasonfuroat konnte auf Grund seiner sehr schlechten Löslichkeit in der wässrigen Phase kein Wert ermittelt werden. Gemäß den Erwartungen soll der Mometasonfuroat-Log P den höchsten Wert im Vergleich zu den weiteren Modellsubstanzen erreichen. Die verwendete Shake Flask-Methode gilt streng genommen nur für den Lipophilie-Bereich von - 2 bis +4. Lipophilere Moleküle sind mit der im folgenden beschriebenen chromatographischen Methode besser zu erfassen.

K_{IAM}-Wert

Die Verwendung von Octanol als Modelllipid wird in neueren Untersuchungen zunehmend als nicht ideal betrachtet. Daher wird z.B. die Bestimmung des K_{IAM}-Wertes als eine ergänzende Methode neben der Log P-Bestimmung empfohlen. Der K_{IAM}-Wert gehört zu den Parametern, die Interaktionsmechanismen zwischen der Testsubstanz und der biologischen Membran, inklusive der Haut, vorhersagen können.

Die K_{IAM}-Bestimmung ist eine modifizierte HPLC Methode, in der die stationäre Phase mit Phosphatidylcholin funktionalisiert wurde (s. Kapitel 10.4.2). Die an die Silicapartikel gebundenen Phospholipidbausteine werden als immobilisierte künstliche Membran (immobilized artificial membrane) bezeichnet, da deren Aufbau einer Zellmembran ähnlich ist. In der folgenden Abbildung sind die Wechselwirkungen zwischen der Membran und dem

Wirkstoff sowie die Wechselwirkungen zwischen der Säule und dem Wirkstoff schematisch darstellt.

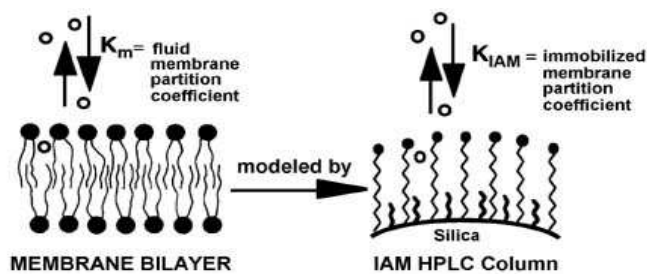


Abb. 4.6: Verteilungskoeffizient an IAM-Phasen (Quelle: Regis Technologies; www.registech.com)

Der aus den chromatographischen Parametern (t_R und t_0) ermittelte K_{IAM} -Wert ist ein Maß für die Verteilung einer Testsubstanz zwischen einer immobilisierten, artifiziellen Membran und der umgebenden wässrigen Phase (hier Pufferlösung, pH 7,4). Je größer die sich aus den Retentionszeiten der Substanzen ergebenden K_{IAM} -Werte sind, desto stärker permeieren die Substanzen auch passiv durch biologische Membranen.

Durch Bestimmung des K_{IAM} -Wertes erhält man somit eine Gleichgewichtskonstante, welche die Verteilung einer Substanz zwischen Membran und wässriger Phase beschreibt. In Ergänzung zum Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ahmt die IAM-Phase sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften der Zellmembran nach, welche für die Wirkstoffverteilung zwischen wässrigem Milieu und Membran bzw. dem Transport über die Membran verantwortlich sind.

Die hier untersuchten Stoffe besaßen zum Großteil eine lipophile Steroidstruktur, daher waren hohe K_{IAM} -Werte zu erwarten. Die Ergebnisse der Bestimmung des K_{IAM} -Wertes sind in Tab. 4.7 dargestellt.

Tab. 4.7: K_{IAM} -Werte der Substanzen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=3$

Substanz	K_{IAM} -Wert	Log K_{IAM}
	MW \pm SD	
Betamethasonvalerat	10,99 \pm 0,0072	1,04
Clobetasolpropionat	11,04 \pm 0,0031	1,04
Hydrocortison	7,56 \pm 0,0037	0,88
Mometasonfuroat	11,68 \pm 0,0078	1,07
Testosteron	10,13 \pm 0,0912	1,01
Koffein	1,30 \pm 0,0044	0,11

Die Glucocorticoide zeigen eine starke Interaktion mit der künstlichen Membran und können als hochpermeabel eingestuft werden. Die K_{IAM} -Werte der Steroide lagen zwischen 7,56 für Hydrocortison und 11,68 für Mometasonfuroat. Der K_{IAM} -Wert des Koffeins lag in Übereinstimmung mit den Literaturangaben bei 1,3 [Nasal et al. 1995]. Abb. 4.7 stellt die gemessenen K_{IAM} -Werte graphisch dar.

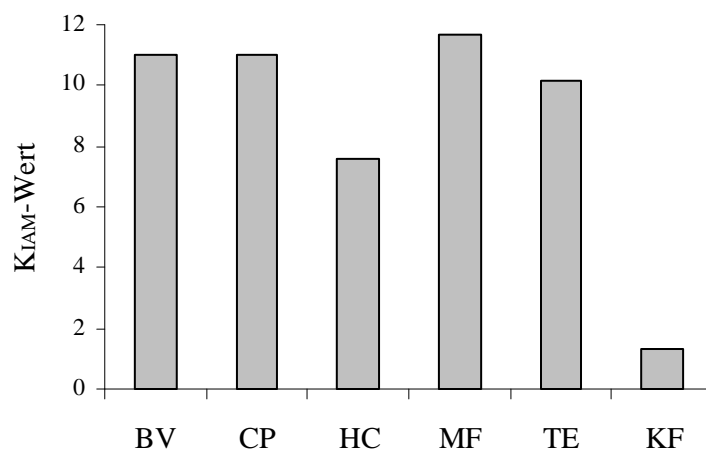


Abb. 4.7: K_{IAM} -Werte der Testsubstanzen

Vergleich Log P/ K_{IAM} -Werte

Die Ergebnisse der beiden Methoden zur Vorhersage der Membranpermeabilität wurden miteinander korreliert. Mometasonfuroat wurde in der Korrelation nicht berücksichtigt, da eine experimentelle Bestimmung des Log P-Wertes nicht möglich war. Das Ergebnis dieser Korrelation ist in Abb. 4.8 dargestellt.

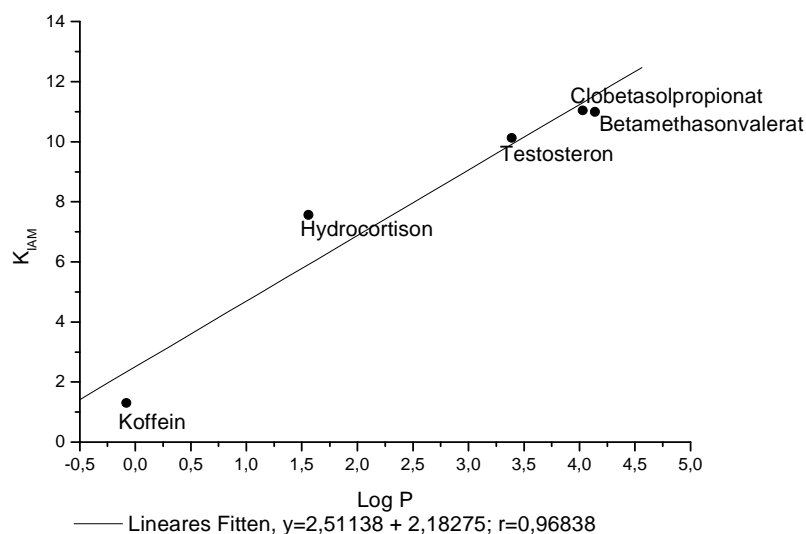


Abb. 4.8: Korrelation K_{IAM} / Log P-Werte (ohne Mometasonfuroat)

Der Korrelationskoeffizient ($r^2=0,9684$) weist auf einen linearen Zusammenhang zwischen dem experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten Log P und dem K_{IAM} -Wert hin. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen von Salminen et al., die eine größere Anzahl von Substanzen (26) miteinander verglichen [Salminen et al. 1997]. Die absoluten Werte unterscheiden sich zwar voneinander, jedoch ist das „Ranking“ fast identisch. Zum Beispiel wies das Koffein den niedrigsten K_{IAM} - und den kleinsten Log P-Wert auf. Clobetasolpropionat und Betamethasonvalerat zeigten bei beiden Methoden die höchsten Messwerte und liegen dicht beieinander. Beide Lipophilieparameter können also zur Vorhersage der Verteilung der Substanzen zwischen Wasser und dem Stratum corneum verwendet werden [Nasal et al. 1995].

Die Korrelation des K_{IAM} -Wertes mit anderen Lipophilieparametern, wie Log P, log D (scheinbarer Verteilungskoeffizient) und Clog P, ist zum Thema vieler wissenschaftlicher Arbeiten geworden [Barbato et al. 1998, Barbato et al. 1997, Barton et al. 1997, Stewart and Chan 1998, Kaliszan et al. 1994, Franke 2000, Beigi et al. 1998, Bernal and Pidgeon 1996]. Dabei wurden sowohl gute als auch schlechte Korrelationen gefunden [Barbato et al. 1998, Barbato et al. 1997, Franke 2000]. Von großem Einfluss auf das Ergebnis der Korrelationen war ein einheitlicher Dissoziationsgrad der Verbindung [Franke 2000]. Nach Barbato et al. kann der K_{IAM} -Wert in einigen Fällen den Wirkstofftransport über die Haut effektiver vorhersagen als der Log P-Wert, weil er zusätzlich Interaktionen mit Phospholipiden berücksichtigt [Barbato et al. 1998]. Darüber hinaus ist der geringe Substanzverbrauch von Vorteil.

4.2.5. Proteinbindung

Serumalbumin ist das häufigste Protein im Blut und hat eine starke Affinität zu vielen Substanzen [Kitamura et al. 2006]. Durch die Bestimmung der Proteinbindung an humanes Serumalbumin kann eine Aussage darüber getroffen werden, zu welchem Anteil eine Substanz im Blut an Plasmaproteine gebunden vorliegt. Der an Protein gebundene Anteil eines Arzneistoffes kann in der Regel nicht glomerulär filtriert und damit nicht renal eliminiert werden. Außerdem tritt ein plasmaproteingebundener Arzneistoff im Allgemeinen nicht mit entsprechenden Rezeptoren in Wechselwirkung und ist damit pharmakologisch inaktiv. Die Hautbarriere besteht ebenfalls zum großen Teil aus Proteinen. Die Bindung an Hautproteine ist reversibel und führt zur Ausbildung von Wirkstoff-Eiweiß-Komplexen, die den Wirkstoff weitgehend inaktivieren. Daher ist die Bestimmung dieses Parameters in Bezug auf den transdermalen Transport von Arzneistoffen von großer Bedeutung.

Die Bestimmung der Proteinbindung erfolgte mittels einer HPLC-Methode mit einer HSA funktionalisierten Säule (s. Kapitel 10.5). Je größer die sich aus den Retentionszeiten der Substanzen ergebenden $k'/(k'+1)$ - Werte auf dieser Säule sind, desto stärker binden die Substanzen wahrscheinlich auch in-vivo an HSA. Die Eignung der Methode wurde unter anderen von Tiller et al. demonstriert [Tiller et al. 1995].

Tab. 4.8: Prozentuale Proteinbindung der Substanzen. Dargestellt sind die durch Schätzfunktion ermittelten Proteinbindungen

Substanz	Prozentuale Proteinbindung
Betamethasonvalerat	> 99 / Stark
Clobetasolpropionat	> 99 / Stark
Hydrocortison	49 / Schwach bis Mittel
Mometasonfuroat	nicht nachweisbar
Testosteron	93 / Stark
Koffein	26 / Schwach

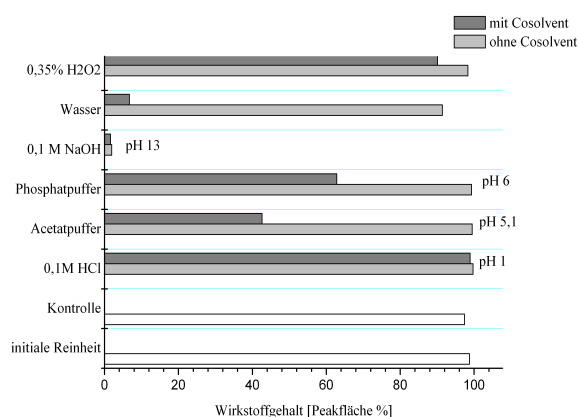
Die lipophilen Steroide binden bis auf Hydrocortison stark an HSA. Koffein bindet nur schwach. Mometasonfuroat war nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den Ergebnissen aus der Löslichkeitsbestimmung. Für Substanzen, die stark an Proteine gebunden werden, wird durch die Zugabe an BSA in den KRB-Puffer eine bedeutsame Löslichkeitsverbesserung im Vergleich zum reinen KRB-Puffer erreicht.

4.2.6. Intrinsische Stabilität

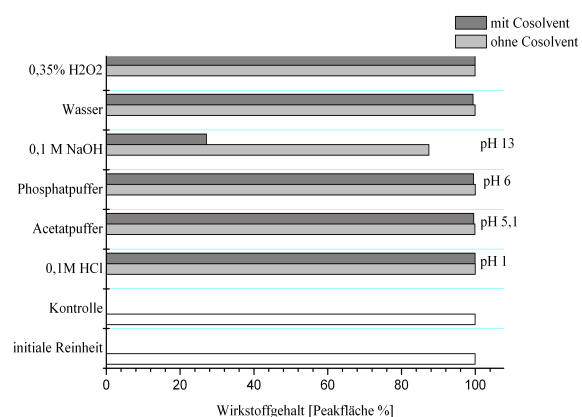
Die Modellsubstanzen wurden hinsichtlich ihres Aussehens, ihres Zersetzungsmusters nach diversen Stresstests mit einer HPLC-Analytik untersucht [siehe Kapitel 10.6]. Das Ziel bestand in der Charakterisierung von intrinsischen Stabilitätseigenschaften der Wirksubstanzen. Die Stressbedingungen wurden so gewählt, dass alle wesentlichen Einflüsse wie Hydrolyse, thermische Zersetzung und Oxidation auf den Wirkstoff berücksichtigt werden. Der hydrolytische Abbau ist neben der Oxidation die häufigste Zersetzungsreaktion bei den Arzneistoffmolekülen [Stricker 1987]. Durch die Zugabe des Cosolvens Acetonitril konnte das Verhalten der Wirkstoffe in Lösung und ohne diesen Zusatz in Suspension untersucht werden.

Bei den Koffeinproben wurde unter allen getesteten Bedingungen keine visuelle Veränderung festgestellt. Bei den Steroidproben wurde in Gegenwart von 0,1 molarer Natronlauge eine Farbveränderung von Weiß nach Gelb beobachtet. Die Stabilität der Modellsubstanzen in Abhängigkeit von der getesteten Stressbedingung ist graphisch in Abb. 4.9 dargestellt.

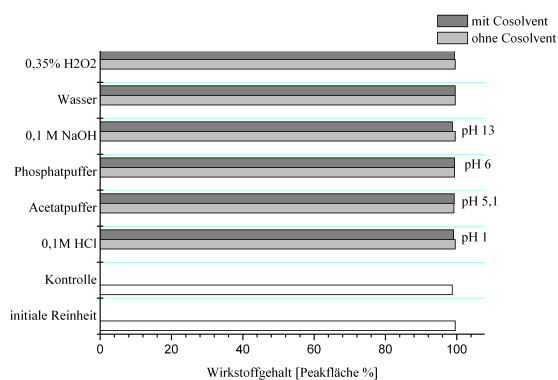
Zusätzlich wird in dieser Graphik die Abhängigkeit der Stabilität vom pH-Wert der angesetzten Stressbedingung: 0,1 M HCl (pH 1), Acetatpuffer (pH 5,1), Phosphatpuffer (pH 6) und 0,1 M NaOH (pH 13) berücksichtigt. Alle Modellsubstanzen zeigten nach Zugabe von 0,35% Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel eine sehr geringe Empfindlichkeit. Generell waren die Zersetzungsreaktionen in Gegenwart des Cosolvens, d.h. in Lösung, immer stärker ausgeprägt. Wie Abbildung 4.9 zeigt, ist die Zersetzung bei pH 13 rascher als bei niedrigeren pH-Werten. Die Hydrolysereaktion verläuft abhängig vom pH-Wert umso schneller, je höher der verwendete pH-Wert ist. Betamethasonvalerat hydrolysiert leicht zu Betamethason insbesondere in Gegenwart von NaOH, wo ein fast vollständiger Wirkstoffabbau stattfindet. Betamethasonvalerat ist deutlich instabiler als die zwei weiteren Glucocorticoidester. Clobetasolpropionat wird nur in Gegenwart von NaOH abgebaut. Hier ist die Hydrolyse ebenfalls als Hauptdegradationsweg anzusehen. Mometasonfuroat wird ähnlich wie Clobetasolpropionat nur in Gegenwart von NaOH abgebaut. Testosteron war bei allen Bedingungen relativ stabil. Die einzige Bedingung, die zu einem auffälligen Ergebnis geführt hat, war die 4-tägige Lagerung in Gegenwart von HCl und Acetonitril als Cosolvens. Hier wurden undefinierbare früh eluierende Peaks detektiert. Hydrocortison ist relativ stabil in Gegenwart von Wasser und HCl ohne Cosolvens. Mit Acetonitril als Cosolvens findet ein Abbau bei diesen Bedingungen statt. In Gegenwart von NaOH wird die Substanz zu ca. 30% abgebaut. Koffein ist bekanntermaßen stabil. Die Substanz ist nur im Basischen leicht empfindlich. Alle Testsubstanzen mit Ausnahme von Betamethasonvalerat waren in Gegenwart von Wasser relativ stabil.



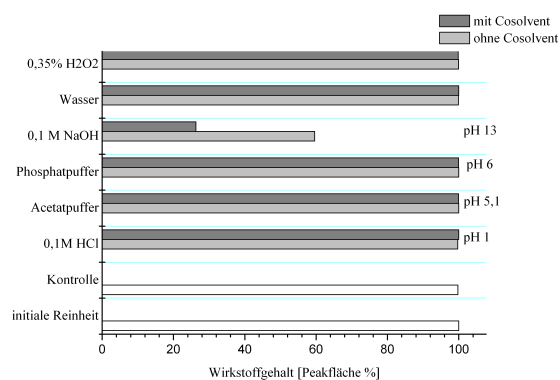
Betamethasonvalerat



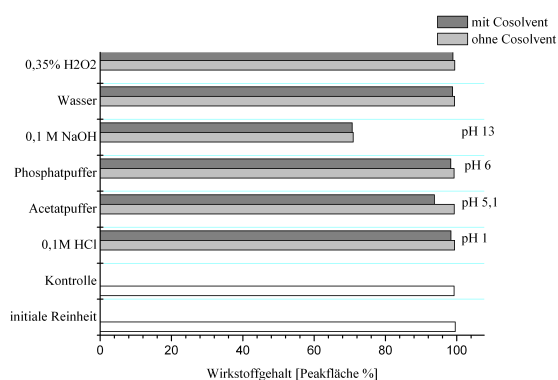
Clobetasolpropionat



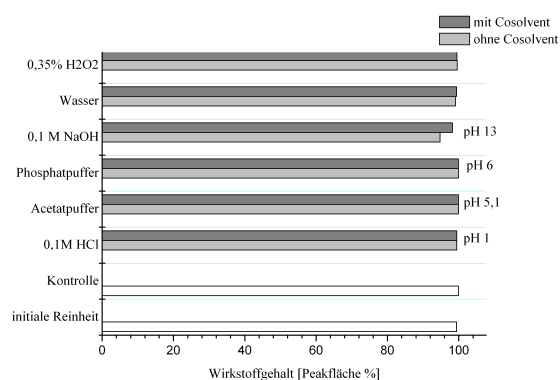
Testosteron



Mometasonfuroat



Hydrocortison



Koffein

Abb. 4.9: Wirkstoffgehalt in Abhängigkeit der Stressbedingung

Als Beispiel wird das Chromatogramm einer unbehandelten Betamethasonvaleratprobe (Abb. 4.10) und das Chromatogramm von Betamethasonvalerat in 0,1 M NaOH mit Acetonitril als

Cosolvens (Abb. 4.11) dargestellt, wo als Hauptabbauprodukte Betamethason (Retentionszeit von 2,3) und Betamethason-21-Valerat (Retentionszeit von 5,8) detektiert wurden.

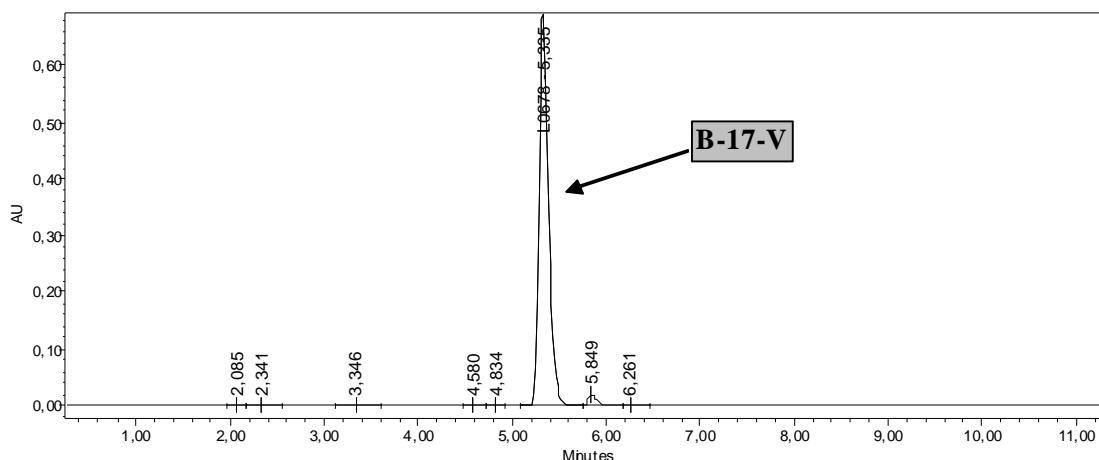


Abb. 4.10: Chromatogramm einer unbehandelten Betamethasonvalerat Probe

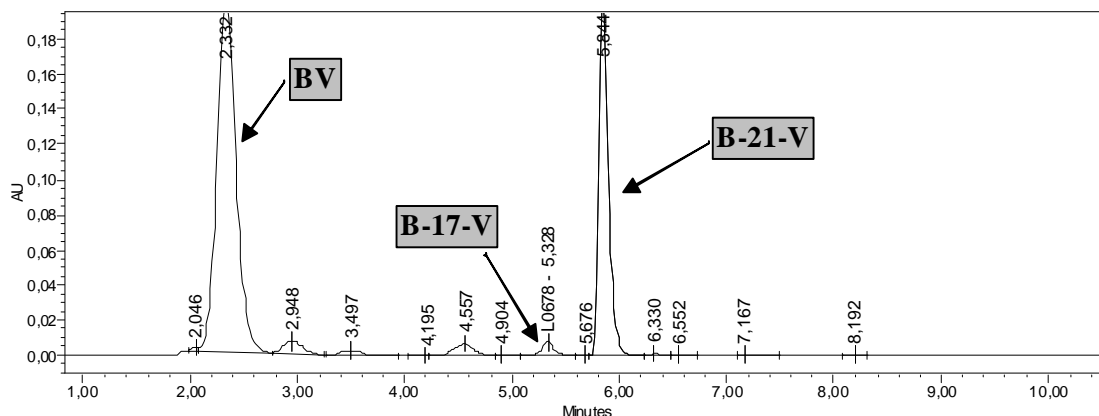


Abb. 4.11: Chromatogramm von Betamethasonvalerat in 0,1 M NaOH und Acetonitril als Cosolvens

Die Corticosteroide sind stabil unter sauren Bedingungen, reagieren jedoch sehr empfindlich auf alkalische Zusätze [Simonsen et al. 2004], was in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte. Im Allgemeinen liegt ihr Stabilitätsoptimum im Bereich von pH 4-6.

Die hier beobachtete ausgeprägte Zersetzung von Hydrocortison unter stark alkalischen Bedingungen stimmt mit den Ergebnissen von Gupta überein [Gupta 1978]. Es ist bekannt, dass die Dihydroxyacetonkette von Hydrocortison in wässrigen und alkoholischen Lösungen bei sehr stark sauren und teilweise auch bei alkalischen pH-Werten einer oxidativen Umgruppierung und Degradation unterliegt [Florey 1983]. Des weiteren sind die in Abb. 4.12 angeführten Abbau- und Umlagerungsreaktionen des Rings A bekannt [Allen und Gupta 1974].

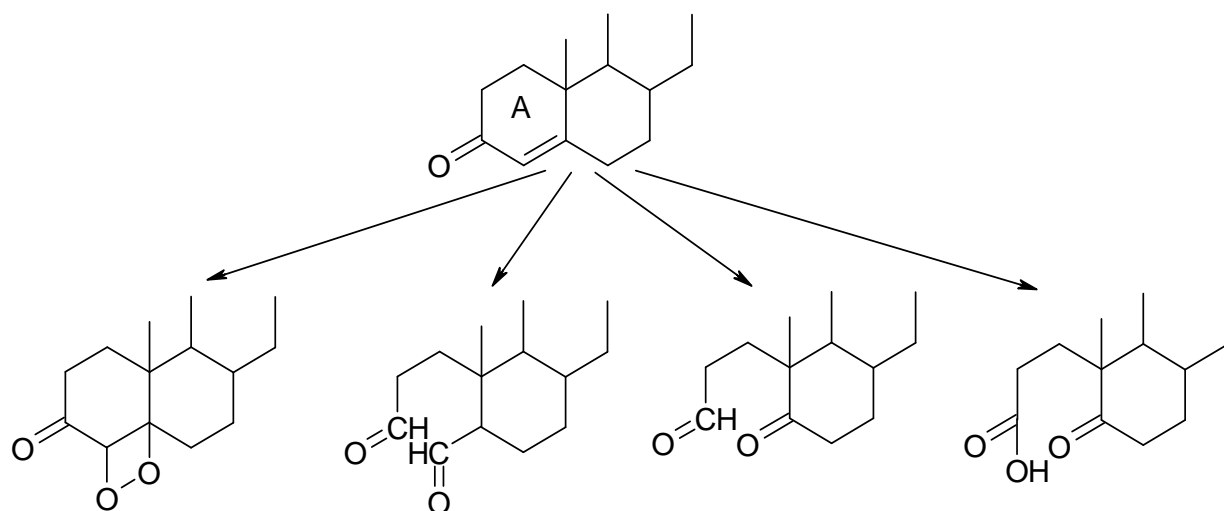


Abb. 4.12: Abbau im Ring A des Hydrocortisons [Allen und Gupta 1974]

Hansen und Bundgaard haben Untersuchung bezüglich der Degradation von Hydrocortison in wässrigen Lösungen unternommen [Hansen and Bundgaard 1980]. Ein Ergebnis ihrer Untersuchungen war, dass sich zwei Zersetzungswege von Hydrocortison beobachten ließen. Ein Weg ist die oxidative Zersetzung, die zur Bildung von 21-Dihydrohydrocortison führt, welches in zwei weitere Säurederivate abgebaut wird. Die Alternative ist eine nichtoxidative Zersetzung des Hydrocortison in 17-deoxy-21-Dihydrohydrocortison (Abb. 4.12). Die von ihnen beobachtete Degradation von Hydrocortison war in dem pH-Bereich zwischen 9 und 11 deutlich komplexer (nähere Informationen siehe Hansen and Bundgaard 1980). Sie haben ebenfalls gezeigt, dass Phosphatpuffer die Degradation von Hydrocortison auf Grund der Kontamination mit Metallspuren beschleunigen. Die Stabilität von Hydrocortison in wässrigen Lösungen zeigt ihr Optimum in der Nähe des pH-Wertes 4, was wiederum in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Gupta steht [Gupta 1978]. In der Literatur wurde seine Stabilität in unterschiedlichen halbfesten Formulierungen bei schwach saurem pH-Wert zwischen 5,8-6,6 nachgewiesen [Gupta 1978, Allen und Gupta 1974].

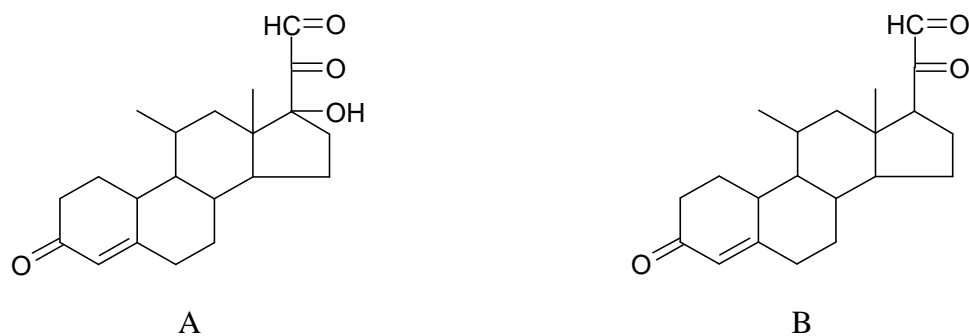


Abb. 4.13: Hauptabbauprodukte von Hydrocortison: 21-Dihydrohydrocortison (A) und 17-deoxy-21-Dihydrohydrocortison (B)

Die Glucocorticoideester unterliegen einer pH abhängigen Hydrolyse und anderen Degradationsreaktionen in wässrigen Lösungen [Teng et al. 2003]. Es ist bekannt, dass die C₁₇-Ester instabil sind und in Gegenwart einer Base oder Säure einer Umgruppierung (Umordnung) zum entsprechenden C₂₁-Ester unterliegen [Bundagaard and Hansen 1981, Teng et al. 2003, Gysler et al. 1999a]. Die Hauptabbauprodukte der synthetischen Steroidester sind schematisch in Abb. 4.14 dargestellt.

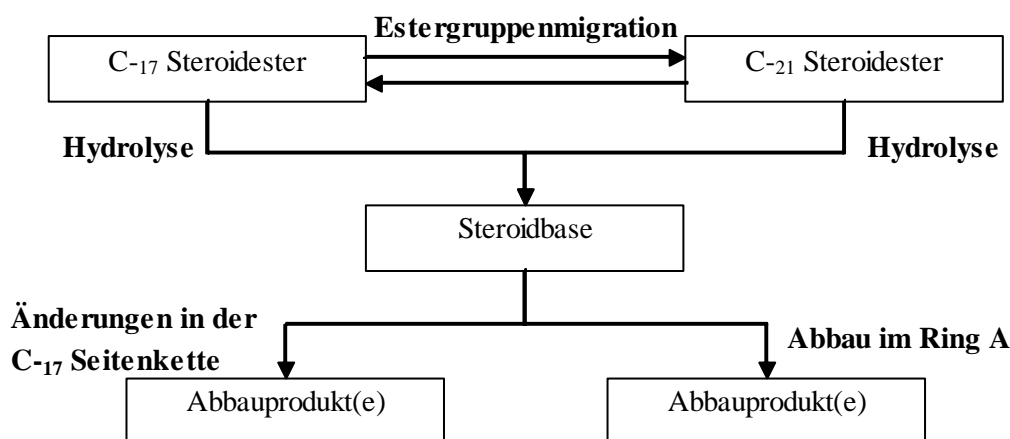


Abb. 4.14: Allgemeines Schemata der Abbaupfade eines synthetischen Steroidesters [Teng et al. 2003]

Clobetasolpropionat ist hydrolyseempfindlich. Sein Stabilitätsoptimum liegt ebenfalls zwischen pH 4 und 6 [GD Gesellschaft für Dermopharmazie 2005], was im Einklang mit dem hier ermittelten Stabilitätsprofil für das Clobetasolpropionat steht.

Die hohe Stabilität von Mometasonfuroat sowohl in Human- und Rattenplasma als auch in Rattenlungen wurde von Sahasranam et al. nachgewiesen [Sahasranam et al. 2005]. Mometasonfuroat ist gemäß den Beobachtungen von Teng et al. stabil bei pH-Werten unter 4 [Teng et al. 2003]. Im Gegensatz zu Teng konnte die Verringerung seiner Stabilität mit wachsenden pH-Werten oberhalb von 4 nicht durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Teng et al. haben dabei vier Abbauprodukte von Mometasonfuroat bei höheren pH-Werten beobachtet, die in Abb. 4.15 dargestellt sind. Die Estergruppenmigration zum C₂₁-Steroidester ist hier auf Grund der Gegenwart des C₂₁-Chlors nicht dominant. Es wurde bewiesen, dass sich die Stabilität und der Widerstand der Substanz gegen den Esterasenabbau in der Epidermis durch die Chlorsubstitution an dem 21-Acyl erhöhen [Prakash und Benfield 1998]. Das könnte die beobachtete höhere Stabilität von Clobetasolpropionat und Mometasonfuroat im Vergleich zu Betamethasonvalerat erklären.

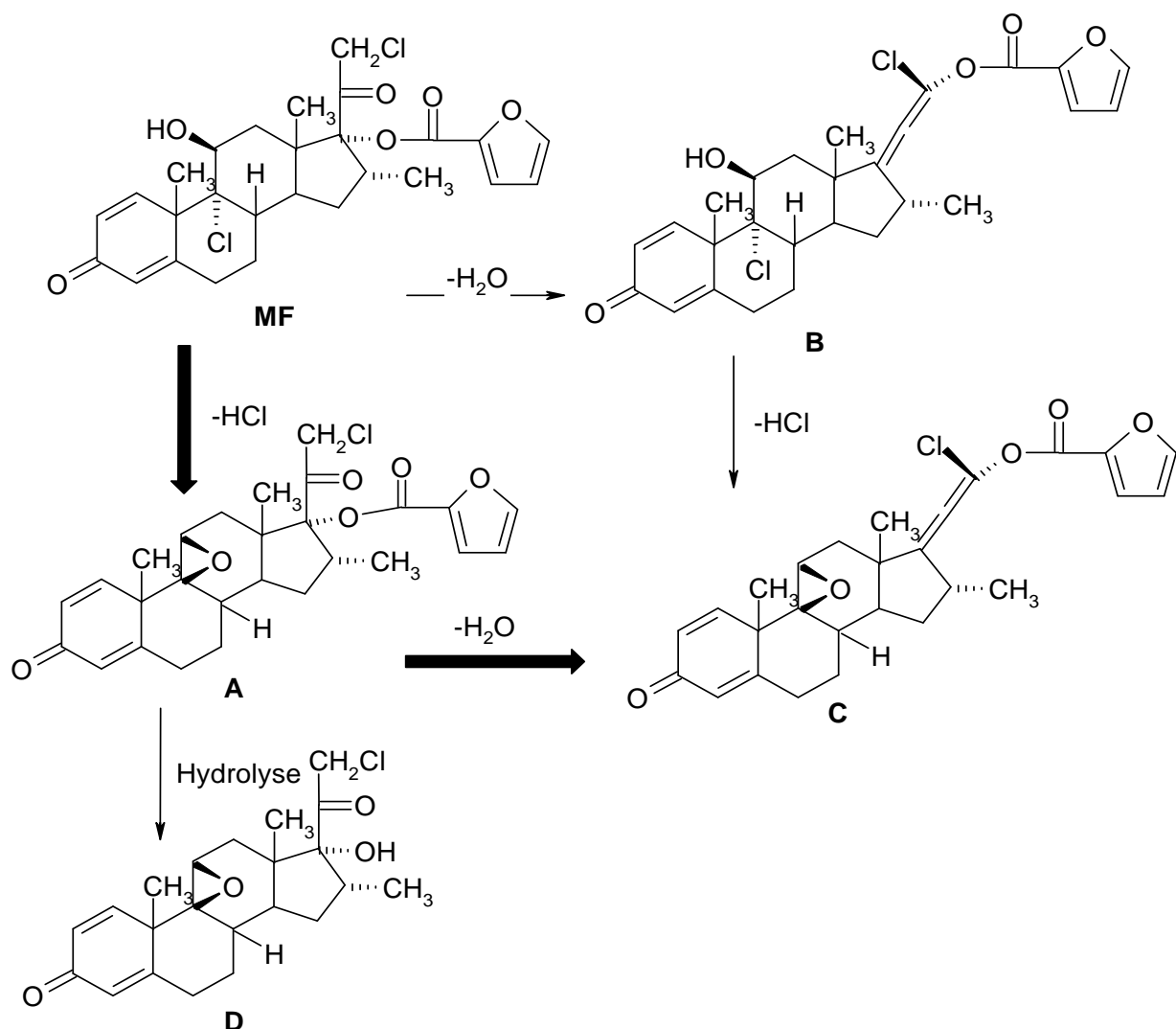


Abb. 4.15: Abbauprodukte von Mometasonfuroat, dickere Pfeilen zeigen den Hauptdegradationsweg [Teng et al. 2003, Sahasranam et al. 2005]

Die Zersetzungsreaktion von Betamethason-17-Valerat wurde von Bundgaard und Hansen beschrieben und erfolgt in zwei Schritten [Bundgaard und Hansen 1981]. Anfänglich erfolgt eine Umesterung von 17-Valerat-Ester zum 21-Valerat-Ester an die sich eine Hydrolyse zu Betamethason anschließt (s. Abb. 4.16). Dabei ist der 21-Valerat-Ester die therapeutisch weniger wirksame Form. Diese Acylmigration von C_{17} zum C_{21} wird sowohl durch Säuren und Basen als auch durch Wasser katalysiert. Das Minimum dieser Reaktion liegt bei einem pH Wert von 3,5. Bei stark sauren pH-Werten erfolgt die Hydrolyse des 21-Valerat-Esters deutlich schneller als die oben beschriebene Acylgruppenmigration. Somit wird Betamethason unter solchen Bedingungen in größeren Mengen und schneller gebildet.

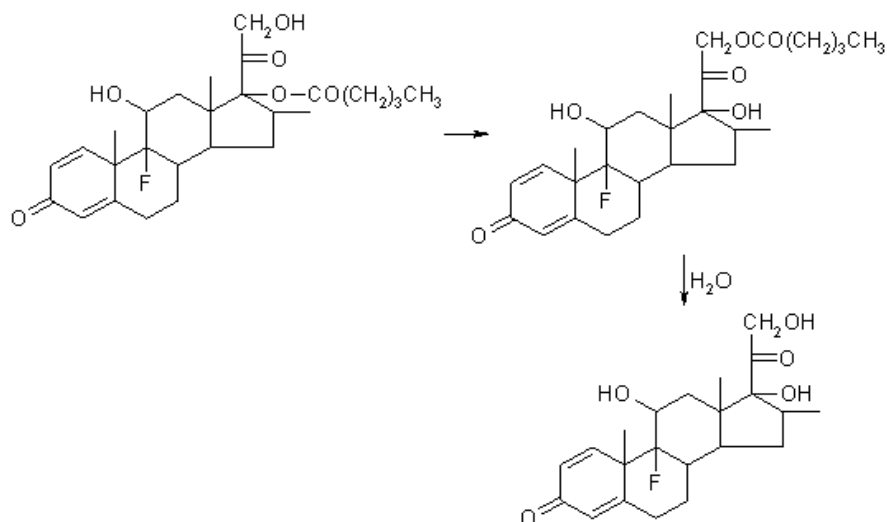


Abb. 4.16: Zersetzungsreaktion von Betamethason-17-Valerat [Bundgaard und Hansen 1981]

Stabilität der Feststoffe

Zur Bestimmung der Stabilität der Feststoffe wurden die Proben unter folgenden Stressbedingungen eingelagert : 25 °C, 60% r.F. und 40 °C, 75% r.F. über vier Wochen und bei 60 °C über vier Tage. Hierbei wurde eine nur minimale Instabilität aller Wirkstoffe (weniger als 1% der Peakfläche wurde im Vergleich zur initialen Reinheit der Substanz abgebaut) beobachtet, was aus den Abb. 4.9 und 5.1 zu ersehen ist.

4.3. Vorhersage des Permeabilitätskoeffizienten anhand von in silico Modellen

Das Ziel lag hier in der Vorhersage des Permeabilitätskoeffizienten anhand von zwei in silico Modellen. In den QSARs werden die experimentell bestimmten Permeationskonstanten mit den physikochemischen Deskriptoren, wie z.B. Schmelzpunkt, Verteilungskoeffizient, Molmasse, korreliert. Auf Grund dieser Korrelationen wird der Transport einer unbekannten Substanz mit bekanntem physikochemischen Profil durch die Haut vorhergesagt [Moss et al. 2002]. Ein erster Ansatz hierzu wurde von Potts und Guy beschrieben [Potts und Guy 1992]. Potts und Guy haben die Permeabilitätskoeffizienten aus in vitro Permeationsstudien über die Haut analysiert und haben einen Zusammenhang zwischen dem Permeabilitätskoeffizienten und dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten sowie der Molmasse der Testsubstanz zeigen können [Potts und Guy 1992]:

$$\text{Log}P_{app} = -6,3 + 0,71 \cdot \text{Log}P - 0,0061 \cdot MW \quad [\text{cm/h}] \quad \text{Gleichung 4.2}$$

MW Molmasse [g/mol]

Log P Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient

Dieses Modell ist sehr einfach und basiert auf der Annahme, dass das Stratum corneum die einzige Barriere beim Wirkstofftransport über die Haut bildet. Somit wird diese Gleichung zu einer Überschätzung des Permeationskoeffizienten für stark lipophile Substanzen führen.

Wilschut et al. haben fünf mathematische Modelle zur Vorhersage der Hautpermeabilität, unter anderen auch das in silico Modell von Potts und Guy, geprüft und validiert [Wilschut et al. 1995]. Das Ergebnis ihrer Untersuchung war, dass sich das modifizierte Modell von Robinson am besten zur Abschätzung des Permeationskoeffizienten, besonders für stark lipophile und hydrophile Substanzen, eignet. In diesem Modell wurde zusätzlich neben der epidermalen Barriere der Einfluss der tieferen Hautschichten auf den transdermalen Transport der Substanzen berücksichtigt:

$$P_{app} = \frac{1}{\frac{1}{P_{appSc} + P_{appPol}} + \frac{1}{P_{appAq}}} \text{ [cm/h]} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

P_{appSc} Permeationskoeffizient in den Lipiden des Stratum corneum

$$\text{Log}P_{appSc} = -1,326 + 0,6097 \cdot \text{Log}P - 0,1786 \cdot MW^{0,5}$$

P_{appPol} Permeationskoeffizient in den Proteinen des Stratum corneum

$$P_{appPol} = \frac{0,0001519}{\sqrt{MW}}$$

P_{appAq} Permeationskoeffizient in den hydrophilen Hautschichten

$$P_{appAq} = \frac{2,5}{\sqrt{MW}}$$

Beide Gleichungen können zur Vorhersage der Wirkstoffpermeabilität durch die Haut auf Grund zweier einfach zu bestimmender physikochemischer Parametern dienen. Für alle Testsubstanzen wurden die Permeabilitätskoeffizienten nach der Potts-und-Guy-Gleichung (Gleichung 4.2) und anhand des Modells von Wilschut (Gleichung 4.3) berechnet. Statt des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten wurde der Octanol/Puffer-Verteilungskoeffizient verwendet, was allerdings nur zu kleinen Abweichungen führen sollte.

Tab. 4.9: Vorhersage des Permeabilitätskoeffizienten nach der Korrelation von Potts und Guy und Wilschut

Wirkstoff	Log P	MW [g/mol]	P _{app} nach Potts & Guy [cm/s]	P _{app} nach Wilschut [cm/s]
Betamethasonvalerat	4,14	476,59	5,40E-07	5,46E-07
Clobetasolpropionat	4,03	466,98	5,16E-07	5,13E-07
Hydrocortison	1,56	362,47	3,95E-08	4,88E-08
Mometasonfuroat	3,70	521,44	1,40E-07	1,98E-07
Testosteron	3,39	288,43	2,23E-06	1,37E-06
Koffein	-0,08	194,19	2,88E-08	4,10E-08

Beide Modelle liefern vergleichbare Ergebnisse. Es besteht eine gute Korrelation zwischen den anhand diesen Modellen vorhersagten Permeationskoeffizienten ($r^2=0,9675$). Folgendes Permeationsranking wurde nach den Gleichungen 4.2 und 4.3 in der Gruppe der Modellsubstanzen vorhergesagt:

$$TE > BV > CP > MF > HC > KF.$$

In den letzten Jahren wurden viele weitere Beiträge zu diesem Gebiet geleistet. Magnusson et al. konnten in ihren Korrelationen zeigen, dass die Molmasse die wichtigste Determinante bei der Vorhersage des maximalen Flux bildet [Magnusson et al. 2004]. Da eine bessere Korrelation zwischen dem Retentionsfaktor auf der IAM-Säule und der Hautpermeabilität als zwischen dem Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient für eine Steroidgruppe beobachtet wurde [Nasal et al. 1995], wäre es interessant zu prüfen, ob sich der Kapazitätsfaktor einer Substanz auf einer IAM-Säule besser zur Vorhersage des transdermalen Transports von Wirkstoffen in QSARs eignet. Eine zu kleine Anzahl der Wirkstoffmodelle erlaubt das allerdings nicht.

4.4. Zusammenfassung und Diskussion

Zur physikochemischen Charakterisierung der Modellsubstanzen wurden folgende Parameter und Eigenschaften bestimmt: Löslichkeit, Schmelzpunkte, Verteilungskoeffizienten Log P und K_{IAM} , Proteinbindung und Stabilität. Eine gute Korrelation zwischen den beiden Verteilungskoeffizienten und der Proteinbindung wurde beobachtet.

Die klassischen Methoden zur Bestimmung der Löslichkeit basieren auf der shake-flask Methode [OECD 1995]. Diese Technik ist jedoch sehr zeitaufwendig und verlangt große Mengen der Testsubstanz. Für diese Methode spricht jedoch, dass sie von regulatorischer Seite akzeptiert ist. Eine Alternative bietet hier die Nephelometrie. Der wesentliche Vorteil

dieser Methode ist der sehr geringe Substanzbedarf und eine kurze Messzeit zur Erhebung der Daten ohne Entwicklung und Validierung einer analytischen Methode, was besonders interessant für neue Wirkstoffskandidaten ist. Die Ergebnisse aus der nephelometrischen Messung waren jedoch nicht immer eindeutig. Resümierend lässt sich sagen, dass die nephelometrische Löslichkeitsbestimmung sehr gut zur groben Abschätzung der Löslichkeit von Substanzen dienen kann und ihre Anwendung daher zur Charakterisierung früher Entwicklungskandidaten von großem Vorteil ist.

Anhand der Löslichkeitsangaben kann eine Auswahl eines geeigneten Akzeptormediums für Permeationsversuche getroffen werden. Hier wurde KRB-Puffer pH 7,4 für die Versuche mit Koffein, Testosteron und Hydrocortison gewählt. Für die Transportversuche mit den drei schwerlöslichen Modellsubstanzen Mometasonfuroat, Betamethasonvalerat und Clobetasolpropionat wird ebenfalls KRB Puffer verwendet, nur wird dem Medium 1% BSA zugesetzt, um eine entsprechende Löslichkeit und damit Sink-Bedingungen bei den in vitro Absorptionsuntersuchungen zu gewährleisten. Die Schmelzpunkte von Koffein, Hydrocortison und Mometasonfuroat lagen über 200 °C. Entsprechend den Angaben von Daniels sollte der Schmelzpunkt eines optimalen Kandidaten für den transdermalen Transport jedoch unterhalb von 200 °C liegen [Daniels 2004]. Für Betamethasonvalerat und Clobetasolpropionat wurden ebenfalls Schmelzpunkte in der Nähe dieser Grenze bestimmt.

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten, Log P und K_{IAM} , ermöglicht die Einschätzung der Membranpermeabilität von Substanzen [Bohets et al. 2001]. Es besteht eine Korrelation zwischen den beiden Verteilungskoeffizienten. Die lipophilen Steroide wiesen erwartungsgemäß im Vergleich zu Koffein sowohl hohe K_{IAM} -Werte als auch hohe Log P-Werte auf. Für die Transportversuche ist also mit einer hohen Membranpermeabilität zu rechnen. Die Bestimmung des physikochemischen Parameters K_{IAM} erlaubt substanzspezifische Permeationseigenschaften in einem sehr frühen Stadium des Entwicklungsprozesses zu screenen und ermöglicht eine Differenzierung zwischen niedrig- und hochpermeablen Substanzen hinsichtlich der Wechselwirkung mit Membranlipiden. Zur Ausbildung der intermolekularen Wechselwirkungen an IAM-Säulen tragen sowohl lipophile als auch ionische Effekte bei. Die angewandte Methode verlangt nur sehr geringe Mengen an Testsubstanz, wobei als einzige Voraussetzung eine Absorption im UV-Bereich vorliegen muss. Ein weiterer großer Vorteil der IAM-Chromatographie ist, dass die Analyse einer großen Anzahl von Substanzen schnell, kostengünstig und reproduzierbar durchgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu erscheint hier die experimentelle Log P-Bestimmung deutlich zeitintensiver. Außerdem ist der Testsubstanzenverbrauch relativ hoch. Log P-Werte

können jedoch auch rechnerisch mittels kommerziellen Programmen auf Grund der chemischen Struktur, wie z.B. Advanced Chemistry Development Labs. (Toronto, Kanada), abgeschätzt werden, was zu sehr guten Ergebnissen führt [Dias et al. 1999]. Diese Möglichkeit sollte in der früheren Entwicklungsphase bevorzugt werden, da hier niedrigere Kosten als im Falle experimenteller Bestimmungen anfallen.

Die Steroide wiesen mit Ausnahme von Hydrocortison eine sehr starke Proteinbindung auf. Es wird somit erwartet, dass es zur Ausbildung von Wirkstoff-Eiweiß-Komplexen in den Hautschichten kommt. Der gebundene Wirkstoffanteil stellt dabei eine inaktive, kutane Speicherform dar. Im Gegensatz zu diesen lipophilen Substanzen bindet Koffein nur schwach an HSA.

Die bestimmten physikochemischen Parameter der Modellsubstanzen sind in Tab. 4.10 zusammengefasst.

Tab. 4.10: Zusammenfassung der physikochemischen Eigenschaften der Modellsubstanzen

Wirkstoff	MW [g/mol]	c _s in KRB [µg/mL]	mpt [°C]	Log P	K _{IAM}	Proteinbindung [%]
BV	476,59	12,97	195,77	4,14	10,99	> 99
CP	466,98	1,61	197,69	4,03	11,04	> 99
HC	362,47	333,02	221,77	1,56	7,56	49
MF	521,44	<0,01	227,61	n.q.	11,68	n.q.
TE	288,43	28,84	152,44	3,39	10,13	93
KF	194,19	24451,60	235,78	-0,08	1,30	26

Mit Hilfe des Stresstests konnte die intrinsische Empfindlichkeit der Modellsubstanzen erkannt werden. Die ausgewählten Substanzen wiesen unterschiedliche Stabilitätsprofile auf. Steroide, besonders Betamethasonvalerat, Mometasonfuroat, Clobetasolpropionat und Hydrocortison, zeigen demnach eine für die Entwicklungsphase zu berücksichtigende relativ ausgeprägte Basenlabilität. Die Empfindlichkeit gegenüber Säuren ist bei allen Testsubstanzen wesentlich schwächer ausgeprägt. Bei der Hilfsstoffauswahl ist daher drauf zu achten, dass insbesondere basebildende Salze nach Möglichkeit vermieden werden. Der optimale pH-Wert der Grundlagen sollte im basischen Bereich insgesamt nicht den Wert 7 auf Grund der beobachteten Instabilitäten überschreiten. Alle Modellsubstanzen zeigen nur eine geringe Oxidationsempfindlichkeit. Daher ist die Zugabe an Antioxidantien nicht erforderlich. Die aus der Literatur bekannten Inkompatibilitäten konnten im Stresstest alle aufgedeckt werden.

Anhand zweier einfach zu bestimmender oder zu berechnender physikochemischer Eigenschaften der Testsubstanzen wurden die apparenten Permeationskoeffizienten mittels der QSARs vorhergesagt [Potts und Guy 1992, Wilschut et al. 1995]. Der Nachteil der *in silico* Vorhersage ist, dass diese Modelle grundsätzlich mit Hilfe der Daten von hoch permeablen Substanzen entwickelt wurden und dass somit das Verhalten von Substanzen mit potentiellen Transportschwierigkeiten sehr schlecht vorhersagbar ist [Wilschut et al. 1995]. Eine andere Beschränkung der *in silico* Modelle ist die große Variabilität der in der Literatur publizierten experimentellen Daten, auf denen die Kalkulationen basieren [Moss et al. 2002, Magnusson et al. 2004]. Diese Daten wurden in verschiedenen Laboratorien, unter unterschiedlichen Bedingungen, anhand von Häuten unterschiedlicher Spender und aus unterschiedlichen Körperregionen gewonnen. Nachteilig scheint ebenfalls, dass die QSAR-Modellen grundsätzlich aus Permeationsdaten aus wässrigen Lösungen stammen. Der Effekt unterschiedlicher Vehikel und Formulierungen auf die Permeation wird hier also ebenfalls nicht berücksichtigt. Erst neuere Studien auf diesem Gebiet beziehen die Eigenschaften des Vehikels, in dem die Substanz inkorporiert ist, in das mathematische Modell ein [Riviere und Brooks 2005]. Abschließend lässt sich sagen, dass die *in silico* Modelle trotz der bisherigen Beschränkungen ein zukünftig wachsendes Potential in der Vorhersage der *in vitro* Permeabilität, Entwicklung und Optimierung der Zubereitungen aufweisen.

Schlussfolgerung

In der präklinischen Entwicklungsphase soll das Permeabilitätspotential einer Entwicklungssubstanz schnell erkannt werden. Eine erste Abschätzung dazu kann auf Grund der Molmasse und des rechnerisch bestimmten Log P-Werts des Wirkstoffs erfolgen. Wenn die Molmasse kleiner als 500 g/mol und Log P-Wert zwischen -1 und +4 liegt, sollte die Substanz relativ gut über die Haut permeieren. Parallel sollte eine analytische Methode entwickelt und validiert werden. Danach können die für die Formulierung und den Transport über die Haut wichtigsten physikochemischen Eigenschaften der aktiven Substanz bestimmt werden. Hierzu gehören Löslichkeit, Verteilungskoeffizient, pKa-Wert und Stabilität der Substanz. Auf der Basis der experimentell bestimmten Wirkstoffeigenschaften lassen sich danach mit Hilfe von *in silico* Modellen etwas genauere Aussagen über die Permeabilität der Substanz treffen.

5. Herstellung der Grundlagen und deren Charakterisierung

5.1. Grundlagenauswahl

Da der Wirkstofftransport durch die Haut maßgeblich durch die Wahl des Vehikels beeinflusst wird [Lieken 2003, Voigt 1995], beschäftigt sich dieses Kapitel mit den verwendeten Grundlagen. Es werden die Kriterien für die Auswahl der Grundlagen näher erläutert. Anschließend werden die ausgewählten Zubereitungen hinsichtlich der Hautpermeation und pharmazeutisch-technologischen Eigenschaften charakterisiert.

Es werden drei verschiedene Zubereitungen untersucht, die sich in ihren galenischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Eine einfache Einteilung kann nach dem Wassergehalt der Grundlage erfolgen. Die drei unterschiedlichen Basisgrundlagentypen wurden so ausgewählt, dass sie einen Vergleich der Wirkstofffreisetzung und Permeation aus einer hydrophilen, hydrophoben und amphiphilen Grundlage ermöglichen. Eine solche Auswahl ermöglicht die Untersuchung der wichtigsten Vehikeinflussfaktoren auf den Wirkstofftransport über die Haut. Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Grundlagenauswahl war eine einfache Herstellung sowie die Möglichkeit der Zubereitungsoptimierung in Phase II des Entwicklungsschemas durch die Einarbeitung sowohl hydrophiler als auch lipophiler Bestandteile. In erster Linie sollen die Standardrezepturen aus den Arzneibüchern berücksichtigt werden, deren Stabilität gewährleistet ist [DAC 1999, DAB 1999].

Im Zuge der einzelnen Anforderungen wurden folgende drei Basisgrundlagen ausgewählt: Basiscreme DAC, Wollwachsalkoholsalbe DAB und Wasserhaltiges Carbomergel DAB [DAC 1999, DAB 1999]. Die genaue Zusammensetzung und Herstellung der ausgewählten Grundlagen ist in Kapitel 10.7 beschrieben.

Die Basiscreme DAC gehört zu den amphiphilen Grundlagen und ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert: weiß, weich, mit Wasser von der Haut abwaschbar, fast ohne Geruch. Amphiphile Cremes stellen einen Übergang zwischen hydrophilen und hydrophoben Cremes dar. Sie enthalten relativ hohe Mengen an Wasser-in-Öl- und Öl-in-Wasser-Emulgatoren. Ohne Brechen des Emulsionssystems können hier sowohl lipophile Substanzen als auch größere Mengen Wasser eingearbeitet werden. Viele handelsübliche Corticosteroidzubereitungen wie auch magistrale Rezepturen basieren auf der Basiscreme DAC, wobei zusätzlich Mittelkettige Triglyzeride (ca. 0,5%) oder/und Zitronensäure 0,5%/Natriumcitrat 0,5%-Lösung (ca. 5%) eingearbeitet werden.

Die Wollwachalkoholsalbe ist eine durchscheinende, gelblichweiße bis gelbliche, weiche Salbe von schwachem Geruch. Diese wasserfreie Grundlage gehört zu den hydrophoben

wasseraufnehmenden Grundlagen. Der Emulgatorzusatz dient bei diesem Grundlagentyp vorwiegend zur Erhöhung der Hautaffinität und der Beeinflussung der Wirkstoffabgabe.

Die dritte ausgewählte Grundlage, das Carbomergel ist ein hydrophiles Gel, das hauptsächlich aus Wasser (96,5%) und einem Quellstoff besteht.

Beispiele der auf dem Markt zugänglichen Präparate mit den verwendeten Wirkstoffen sind im Anhang 3 dargestellt.

Die Stabilität einer Formulierung hängt primär von der Kompatibilität des Wirkstoffs mit den Hilfsstoffen ab [Mukherjee 2005]. Daher werden im ersten Schritt Kompatibilitätsuntersuchungen durchgeführt. Um Informationen über die Eigenschaften der angesetzten Zubereitungen zu erhalten, werden darüber hinaus die nachfolgend aufgeführten Experimente zu ihrer Charakterisierung durchgeführt. Im Vordergrund stehen dabei die physikochemischen Eigenschaften, die eine kritische Rolle bei der Bestimmung der topischen Absorption spielen.

5.2. Kompatibilität

Ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung halbfester Zubereitungen ist die Auswahl von Hilfsstoffen. In den Kompatibilitätsuntersuchungen kommt es darauf an, die Stabilität des Arzneistoffs in Gegenwart von Hilfsstoffen abzuklären. Die Hilfsstoffe können nämlich die Oxidation sowie die Hydrolysegeschwindigkeit der aktiven Substanzen beschleunigen.

Deshalb werden die Testsubstanzen in einer Kompatibilitätsuntersuchung in Verbindung mit den Hilfsstoffen aus den ausgewählten Grundlagen im Verhältnis 1:1 hinsichtlich des Gehaltes und des Abbaus analytisch untersucht [siehe Kapitel 10.8]. Ein 1:1 Verhältnis zwischen Hilfsstoff und Wirkstoff wurde ausgewählt, um die Auswirkung der Hilfsstoffe auf die Wirkstoffstabilität besser zu erfassen. Die Eignung der Hilfsstoffe für die Formulierungsentwicklung sollte dabei erkannt und Schwachstellen möglicher Wirkstoff-Hilfsstoff-Kombinationen aufgedeckt werden. Die gewählten Stressbedingungen sind prädiktiv für entsprechende Wirkstoff-Hilfsstoff-Kombinationen unter Bedingungen der Klimazone II (25 °C/60% r.F.) und für beschleunigte Bedingungen nach ICH (40 °C/75% r.F.) [ICH 1993]. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen unter diesen Bedingungen gelagert.

Die Ergebnisse der Kompatibilitätsuntersuchung sind in Abb. 5.1 dargestellt. Zusätzlich zu den Hilfsstoffen der Basisformulierungen sind hier bereits Additive [Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Isopropylmyristat (IPM) und Saccharosestearat (SS)] der Phase II des Entwicklungsschemas hinsichtlich ihrer Kompatibilität mituntersucht worden.

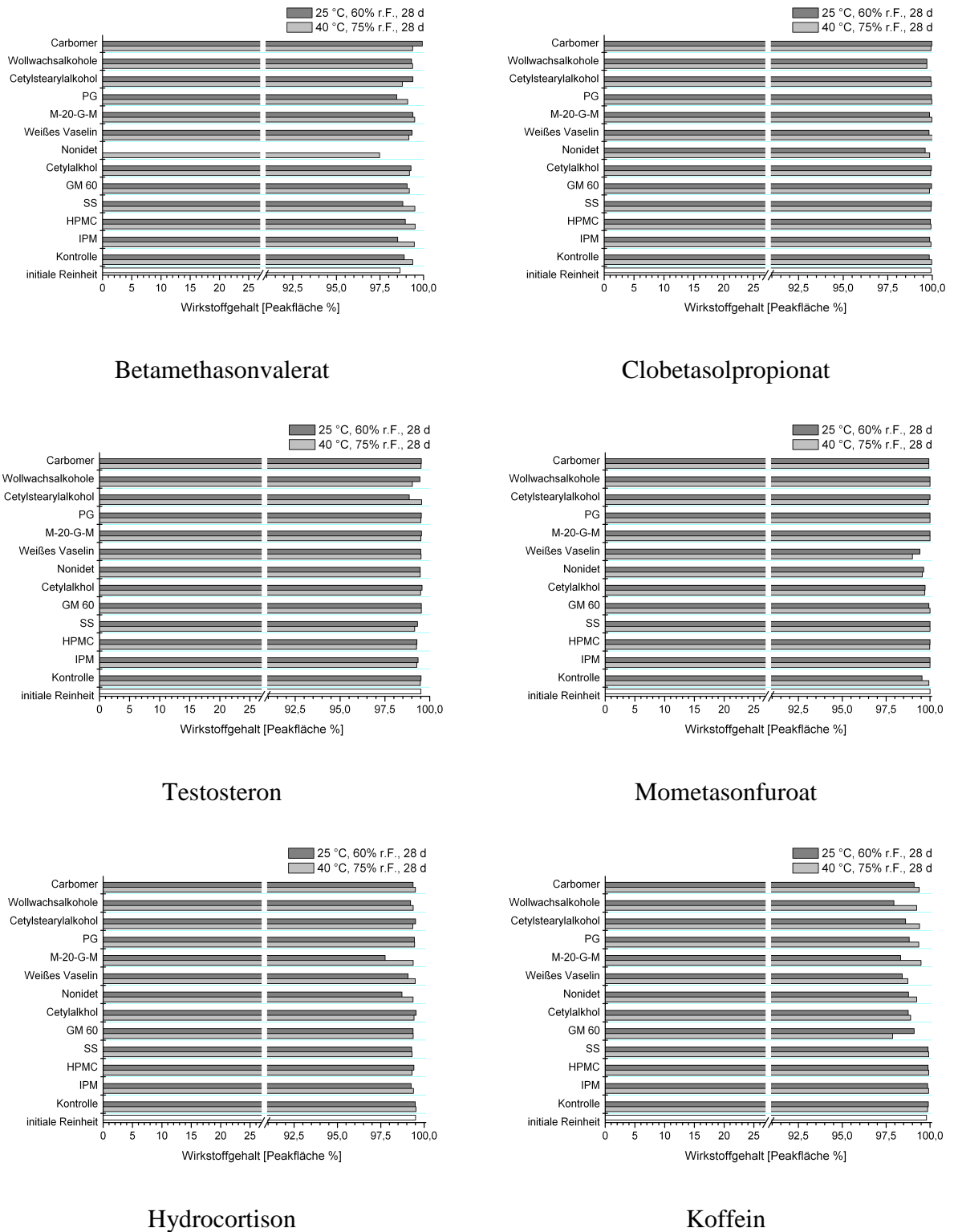


Abb. 5.1: Wirkstoffgehalt nach der Kompatibilitätsuntersuchung. M-20-G-M ist eine Abkürzung für Macrogl-20-glycerol-monostearat, GM 60 für Glycerolmonostearat 60 und PG für Propylenglycol.

Die Untersuchungen ergeben eine sehr gute Kompatibilität der Testsubstanzen mit den Hilfsstoffen. Vaseline beeinflusst die Stabilität von Hydrocortison nicht, was in

Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Gupta ist [Gupta 1978]. Bei Betamethasonvalerat konnte auf Grund eines analytischen Problems die Probe mit dem Nonidet (25 °C, 60% r.F.) nicht ausgewertet werden. Für Betamethasonvalerat wurde eine leichte Inkompatibilität mit dem Propylenglycol beobachtet. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen von Simonsen et al.. Propylenglycol führt zur Hydrolyse der Esterkette des Corticosteroideesters, wie dies im der Fall von Betamethasondipropionat beobachtet wurde [Simonsen et al. 2004]. Bei Kompatibilitätsuntersuchungen wird häufig eine Grenze von 5% entstehender Abbauprodukte gesetzt. Die Überschreitung dieser Grenze wird als Hinweis für eine Inkompatibilität gesehen. Die hier beobachteten Abbauprodukte betrugen in allen Fällen weniger als 5% der gesamten Peakfläche. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass kein Hilfsstoff in einem erheblichen Ausmaß zu einer Zersetzung der hier untersuchten Wirkstoffe führt.

In Bezug auf die intrinsische Stabilität der Wirkstoffe (s. Kapitel 4.2.6.) war die Zersetzung der Testsubstanzen in Gegenwart der Hilfsstoffe deutlich weniger ausgeprägt.

5.3. Charakterisierung der Grundlagen

Die Grundlagen Basiscreme, Wollwachsalkoholsalbe und Carbomergel wurden hinsichtlich Konsistenz, Spreitungsverhalten, Dichte und rheologischer Eigenschaften charakterisiert. Diese Parameter entscheiden über die Einfachheit der Anwendung einer halbfesten Zubereitung, sowie ihre Adhäsion an die Haut und ihre Fähigkeit die Wirkstoffe zum Wirkort zu liefern [Alberti et al. 2005].

5.3.1. Prüfung der Konsistenz durch Penetrometrie

Die Konsistenz der Formulierung wurde mit Hilfe eines Schwerkraft-Penetrometers geprüft, welches genauer im Kapitel 10.9.1 beschrieben ist [EA 2002 2.9.9, Voigt 1995]. Das Penetrometer misst die Eindringtiefe eines normierten Kegels in eine Grundlage unter genau festgelegten Versuchsbedingungen während einer bestimmten Zeit. Die gemessene Eindringtiefe ist dabei ein Maß für die Plastizität oder Konsistenz der untersuchten Probe. Ist die Probe sehr weich, so dringt der Konus tief ein, es resultiert ein hoher Penetrationsgrad. Bei festeren Proben dringt der Prüfkonus weniger tief ein. Die Plastizität einer Formulierung beeinflusst die Wirkstoffliberation aus der Zubereitung. Je höher die Konsistenz einer Grundlage ist, desto langsamer sollte der Wirkstoff freigesetzt werden.

Tab. 5.1: Eindringtiefe des Penetrometermesskonus bei RT, n=3

Grundlage	Eindringtiefe		
	MW [μm]	SD [μm]	RSD [%]
Basiscreme	817	5	0,61
Wollwachsalkoholsalbe	667	19	2,85
Carbomergel	997	5	0,50

Die höchste Eindringtiefe des Prüfkörpers wurde für das Carbomergel beobachtet. Die kleinste Eindringtiefe wurde für die Wollwachsalkoholsalbe gemessen. Die Eindringtiefe des Prüfkonus in die Basiscremeprobe lag zwischen den Eindringtiefen der Salbe und des Gels, jedoch näher bei den Werten für die Wollwachsalkoholsalbe.

5.3.2. Prüfung der Dichte

Die Dichte der Grundlagen wurde zur Berechnung des Permeationskoeffizienten benötigt. Die Ergebnisse der Dichtebestimmung der untersuchten Grundlagen (Kapitel 10.9.2) sind in Tab. 5.2 zusammengefasst.

Tab. 5.2: Scheinbare Dichte der untersuchten Grundlagen bei RT, n=2

Grundlage	Masse			Dichte [g/mL]
	MW [g]	SD [g]	RSD [%]	
Basiscreme	3,24	0,03	0,93	0,810
Wollwachsalkoholsalbe	3,19	0,00	0,00	0,797
Carbomergel	3,79	0,04	1,06	0,946

5.3.3. Prüfung der Spreitung

Unter Spreitung einer Zubereitung versteht man ihre Fähigkeit, sich auf der Haut auszubreiten [Voigt 1995]. Wenn eine Grundlage eine hohe Spreitung aufweist, kann eine größere Applikationsfläche der Haut abgedeckt werden. Für solche Zubereitungen wird daher eine höhere Absorptionsmenge und eine effizientere Wirkung erwartet. Die Bestimmung des Spreitungsverhaltens einer Grundlage wird mit einem Extensometer durchgeführt. Die Ausbreitungsfläche einer sich zwischen zwei Glasplatten befindenden Formulierungsprobe wird dabei vermessen und stellt ein Charakteristikum für die Spreitbarkeit der Grundlage dar (Kapitel 10.9.3).

Die Ergebnisse der Spreitungsbestimmung sind in Tab. 5.3 dargestellt.

Tab. 5.3: Ausbreitungsfläche der Grundlagen, n=3

Grundlage	Durchmesser			Ausbreitungsfläche [mm ²]
	MW [mm]	SD [mm]	RSD [%]	
Basiscreme	88,67	0,47	0,53	6174,63
Wollwachsalkoholsalbe	69,67	1,25	0,02	3811,89
Carbomergel	137,33	0,47	0,34	14812,96

Wollwachsalkoholsalbe zeigt eine gegenüber Basiscreme und Carbomergel verringerte Spreitung. Erwartungsgemäß und gemäß den Ergebnissen der Konsistenzbestimmung weist das Carbomergel die höchste Spreitung auf.

5.3.4. Untersuchung der rheologischen Eigenschaften

Das rheologische Verhalten halbfester Zubereitungen ist ein wichtiges physikalisches Qualitätsmerkmal bei diesen Darreichungsformen. Die Rheologie beschreibt das Fließverhalten von Körpern. Die Viskosität (Zähigkeit) ist ein Maß für den inneren Widerstand gegen das Fließen und wird definiert durch den Reibungswiderstand, den eine Flüssigkeit einer Deformation durch eine Normaldruck- oder Schubspannung entgegensetzt [Ferguson und Kembrowski 1995, Bauer et al. 1999]. Die Untersuchung der rheologischen Eigenschaften von halbfesten Formulierungen dient einerseits zu deren Charakterisierung, kann aber ebenfalls Hinweise auf Veränderungen der Grundlagenstruktur bei den Lagerzeitprüfungen geben [Rose 1999].

Die halbfesten Zubereitungen verhalten sich meistens wie plastische Flüssigkeiten. Solche strukturviskosen Flüssigkeiten, deren Viskositäten von der Scherbeanspruchung abhängen, lassen sich am einfachsten mit einem Rotationsviskosimeter charakterisieren. Beim plastischen Fließen setzt die Fließfähigkeit erst oberhalb einer bestimmten Schubspannung, dem Fließpunkt, ein [Schramm 2000]. Bis zu dieser Schubspannung ist das untersuchte Material formstabil und verhält sich wie ein fester Körper (elastisch). Das System ist nur reversiblen elastischen Deformationen unterworfen. Um plastische Stoffe zum Fließen zu bringen, muss eine kritische Schubspannung, die Fließgrenze, überwunden werden. Die Charakterisierung plastischer Systeme erfolgt somit über die Fließgrenze und die plastische Viskosität.

Bei den rheologischen Messungen wird untersucht, wie eine Probe auf eine durch Messgeometrie übertragene Kraft reagiert. Halbfeste Formulierungen zeigen ein viskoelastisches Verhalten, das bedeutet, dass sie neben viskosen auch mehr oder weniger starke elastische Eigenschaften besitzen. Der struktur-viskose Anteil kann gut mit den

Fließkurven beschrieben werden, die zur Ermittlung der scher- und zeitabhängigen Viskosität sowie der Fließgrenze dienen. Für die Charakterisierung der elastischen Eigenschaften eignen sich besser Messungen unter oszillierender Beanspruchung. Somit können elastische und viskose Eigenschaften in der Probe ermittelt werden. Für die genaue Erklärung der unterschiedlichen rheologischen Charakterisierungsmethoden wird auf die weiterführende Literatur verwiesen [Barry 1983].

Die ausgewählten Messverfahren zur rheologischen Charakterisierung waren die Viskositätsmessung zur Ermittlung der Fließgrenze und des Fließverhaltens, sowie die Oszillationsmessung zur Bestimmung von viskoelastischen Eigenschaften der Grundlagen.

Fließverhalten

Die rein viskosen Eigenschaften einer Probe können durch stationäres Fließen beschrieben werden. Die aufgenommenen Fließkurven der drei Grundlagen sind in den Abb. 5.2-5.4 dargestellt.

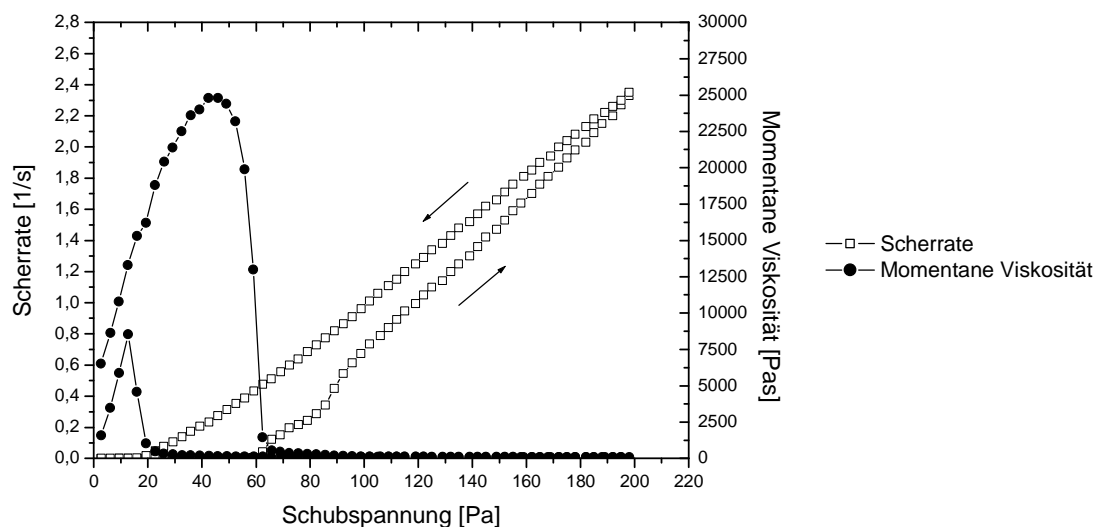


Abb. 5.2: Fließkurve der Basiscreme DAC

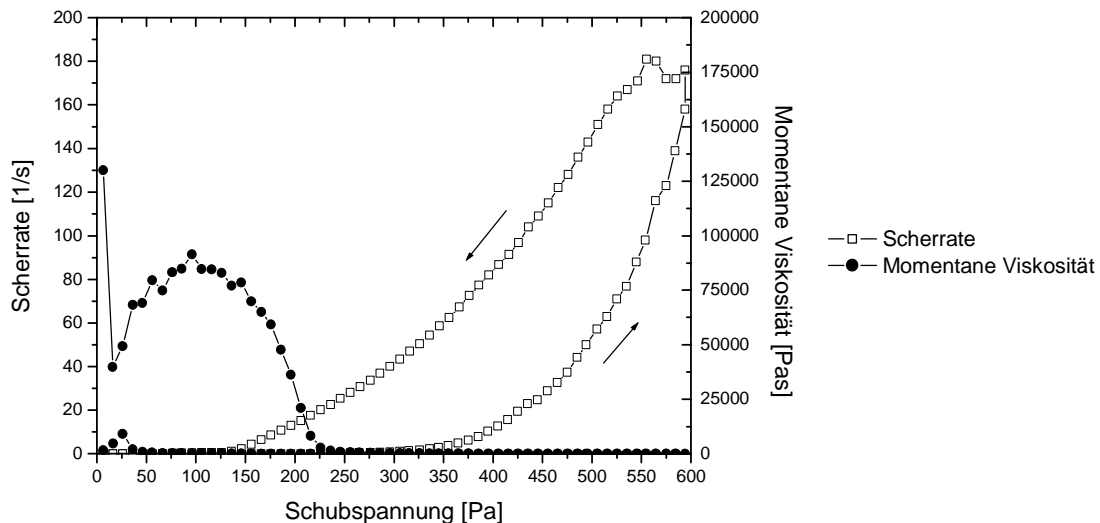


Abb. 5.3: Fließkurve der Wollwachsalkoholsalbe DAB

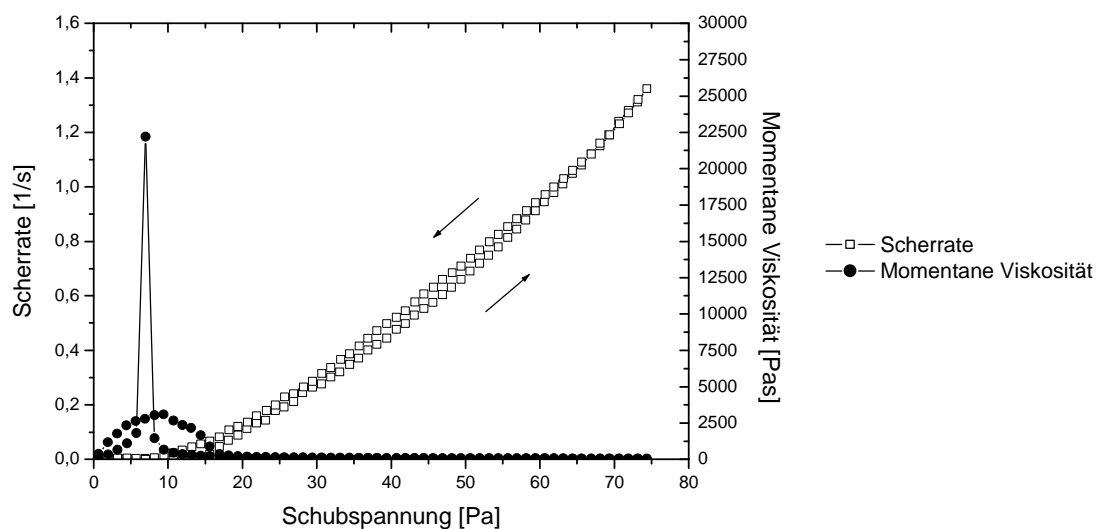


Abb. 5.4: Fließkurve des Carbomergels DAB

Für alle drei Grundlagen ergibt sich das typisch plastische Fließverhalten eines Casson-Körpers. Alle Grundlagen zeigen oberhalb der Fließgrenze eine deutliche Scherverdünnung, am stärksten ausgeprägt bei Wollwachsalkoholsalbe. Bei allen untersuchten Grundlagen tritt eine Verschiebung zwischen der Aufwärts- und Abwärtskurve (Hysteresis) auf. Dies deutet auf ein thixotropisches Verhalten der Proben hin. Es wurde jedoch nicht geprüft, ob eine reversible Thixotropie bei den Grundlagen vorliegt. Bei dem Carbomergel sind die Kurven nur geringfügig gegeneinander verschoben.

Fließgrenze

Die Ermittlung der Fließgrenze der drei Grundlagen ist in den Abb. 5.5–5.7 graphisch dargestellt.

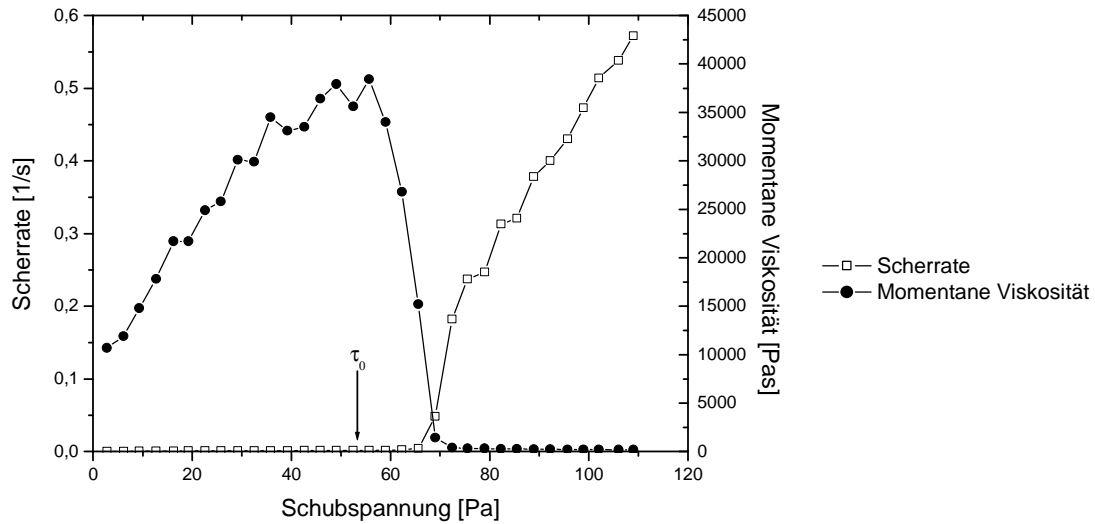


Abb. 5.5: Ermittlung der Fließgrenze für die Basiscreme DAC

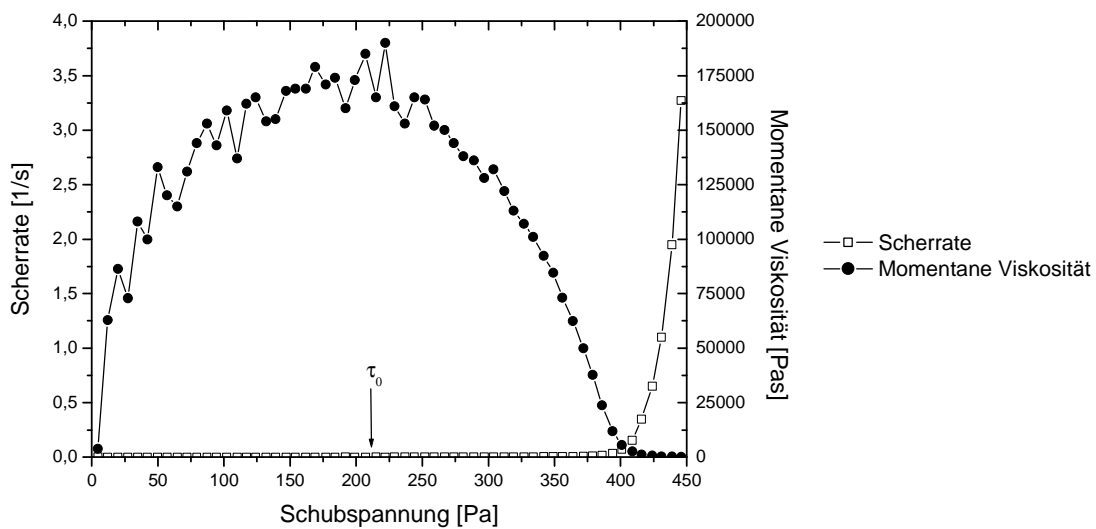


Abb. 5.6: Ermittlung der Fließgrenze für die Wollwachsalkoholsalbe DAB

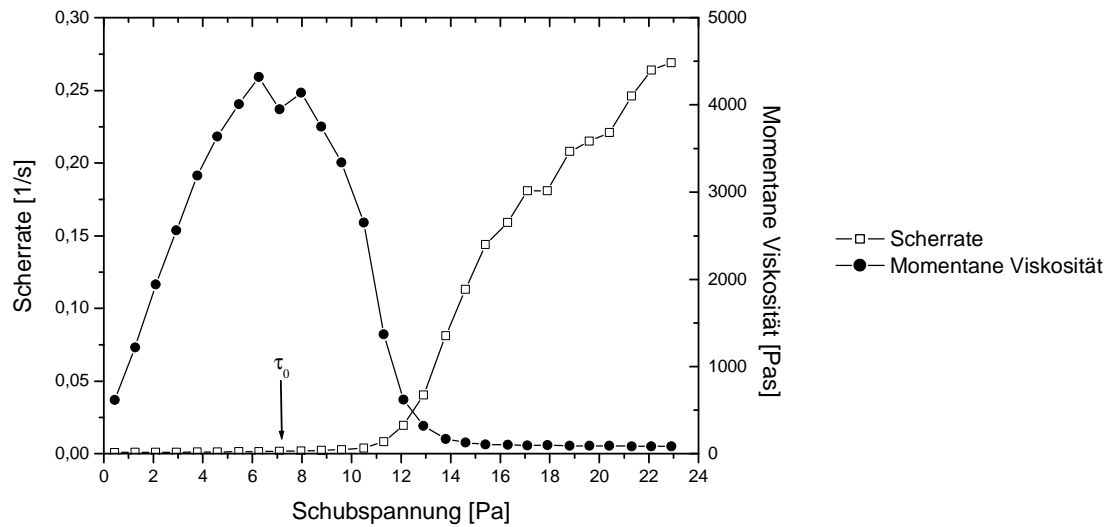


Abb. 5.7: Ermittlung der Fließgrenze für das Carbomergel DAB

Die mit der Auswertesoftware ermittelten Werte für die Fließgrenzen sind in Tab. 5.4 zusammengefasst.

Tab. 5.4: Fließgrenze untersuchter Grundlagen

Fließgrenze [Pa]	Basiscreme	Wollwachsalkoholsalbe	Carbomergel
	52,5	215	7,1

Scheinbare Viskosität

Bei einer konstanten Schubspannung von 70 Pa wurde die scheinbare Viskosität für jede analysierte Grundlage bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5.5 aufgeführt.

Tab. 5.5: Scheinbare Viskosität untersuchter Grundlagen

Grundlage	Basiscreme	Wollwachsalkoholsalbe	Carbomergel
Scheinbare Viskosität [Pa·s]	455,19	79555,25	57,11

Die scheinbare Viskosität der Wollwachsalkoholsalbe liegt deutlich höher als die Viskosität der beiden weiteren Zubereitungen. Carbomergel weist die niedrigste scheinbare Viskosität von allen Grundlagen auf. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen aus der Konsistenzprüfung überein.

Oszillation

Die Oszillationsmessung ermöglicht die Bestimmung der elastischen und viskosen Anteile in einer Probe. Die Probe wird zerstörungsfrei vermessen, solange die Messung im linearen viskoelastischen Bereich erfolgt. Innerhalb dieses Bereiches sind die Kenngrößen wie Phasenwinkel sowie Speicher- und Verlustmodul konstant. Elastizitätsmodul und Verlustmodul sind aber keine konstante Größen. Sie verändern sich mit der Amplitude und Frequenz der angelegten Deformationsfunktion im nichtlinear-viskoelastischen Bereich. Die Probe wird einer sinusförmigen Deformation mit kleiner Amplitude ausgesetzt und reagiert mit einer um den Winkel δ phasenverschoben Antwortfunktion. Diese Phasenverschiebung zwischen Vorgabe- und Antwortfunktion ermöglicht getrennte Erfassung der viskosen und elastischen Eigenschaften der untersuchten Probe. Der dabei ermittelte Speichermodul beschreibt den elastischen Anteil und der Verlustmodul den viskosen Anteil in der Probe. Die maximale Phasenverschiebung von $\delta = 90^\circ$ zeigen rein viskose Substanzen, wie zum Beispiel Wasser. Wenn keine Phaseverschiebung vorliegt ($\delta = 0^\circ$) ist das untersuchte Material rein elastisch. Bei den meisten halbfesten Formulierungen liegen sowohl viskose und elastische Eigenschaften mit einem Phasenwinkel zwischen 0 und 45° vor, so dass im System die elastischen Anteile überwiegen.

Unter oszillatorischer Beanspruchung kann der komplexe Schubmodul G^* ermittelt werden, der den Zusammenhang zwischen Schubspannung und Deformation beschreibt (Gleichung 5.1):

$$\tau = G^* \cdot \gamma \text{ [Pa]} \quad \text{Gleichung 5.1}$$

Mit Hilfe des Phasenwinkels kann der komplexe Schubmodul in Speichermodul G' und Verlustmodul G'' zerlegt werden (Gl. 5.2 und 5.3). Der Speichermodul entspricht dabei der elastisch gespeicherten Energie, die bei einem Phasenwinkel von $\delta = 0^\circ$ gemessen wird. Der Verlustmodul ist ein Maß für die viskos dissipierte Energie und wird bei einem Phasenwinkel von $\delta = 90^\circ$ gemessen.

$$G^* = G' + G'' \text{ [Pa]} \quad \text{Gleichung 5.2}$$

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos \delta \text{ und } G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \sin \delta \text{ [Pa]} \quad \text{Gleichung 5.3}$$

Der Zusammenhang zwischen dem Phasenwinkel und den Modulen beschreibt die Gleichung 5.4:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \text{ [}^\circ\text{]} \quad \text{Gleichung 5.4}$$

Aus der in der Gleichung 5.4 dargestellten Beziehung ist ersichtlich, dass die elastischen Eigenschaften einer Probe um so mehr dominieren, je kleiner der Verlustfaktor $\tan \delta$ ist.

Bei den Oszillationsmessungen muss zuerst der linear-viskoelastische Bereich identifiziert werden. Zu diesem Ziel wird eine Messung als Funktion der Amplitude bei konstanter Frequenz durchgeführt.

Die Standardabweichungen zwischen den einzelnen Messungen der Wollwachsalkoholsalbeproben waren sehr hoch, konnten jedoch durch eine kurze Vorbehandlung der Proben vor der Messung in der Fantaschale hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit verbessert werden. Deshalb wurden alle Wollwachsalkoholproben vor der Messung vorbehandelt.

Die Ergebnisse der Messungen unter oszillierender Beanspruchung sind in der Tab. 5.6 aufgeführt.

Tab. 5.6: Mittelwerte und Standardabweichung der bei der Oszillationsmessungen ermittelten Parametern, $n=3$

Grundlage/Parameter	Basiscreme	Wollwachsalkoholsalbe	Carbomergel
Elastischer Modul G' [Pa]	$14971,61 \pm 1091,42$	$48144,63 \pm 3138,28$	$397,23 \pm 9,70$
Viskoser Modul G'' [Pa]	$4570,52 \pm 303,21$	$21828,80 \pm 1295,16$	$56,05 \pm 5,28$
Phasenwinkel δ [°]	$16,98 \pm 0,33$	$24,41 \pm 0,93$	$8,04 \pm 0,92$

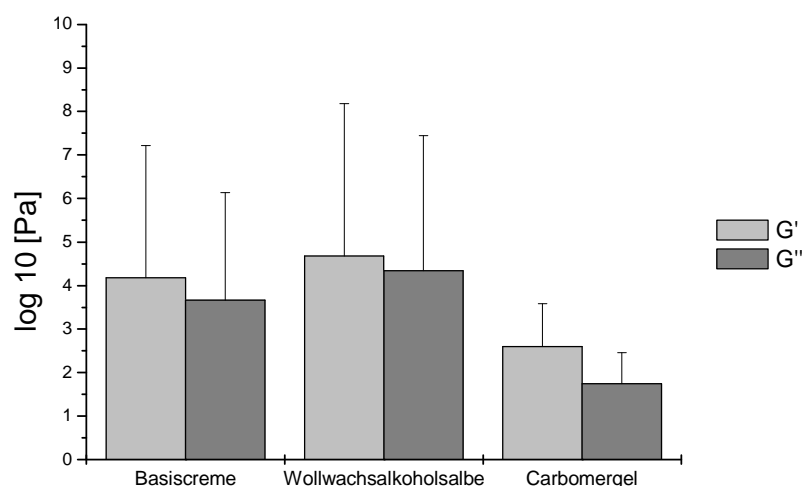


Abb. 5.8: Elastischer und viskoser Modul der Formulierungen in log 10, MW + SD, $n=3$

Der elastische Modul war bei allen getesteten Grundlagen größer als der viskose Modul. Das Carbomergel zeigte von allen Zubereitungen den niedrigsten und die Wollwachsalkoholsalbe den höchsten Phasenwinkel.

5.4. Zusammenfassung und Diskussion

Kompatibilität

Bei den Modellsubstanzen konnte keine bedeutsame Inkompatibilität mit Hilfsstoffen der drei ausgewählten Grundlagen detektiert werden. Die Modellsubstanzen bleiben nach Lagerung unter beiden Bedingungen (25 °C/60% r.F. und 40 °C/75% r.F.) über einen Zeitraum von vier Wochen stabil. Sofern eine neutrale bis leicht saure Umgebung gewährleistet ist, sind keine unvorhersehbaren Inkompatibilitäten mit den ausgewählten Hilfsstoffen zu erwarten.

Konsistenz, Dichte und Spreitung der Grundlagen

Aus der Konsistenzprüfung ist ersichtlich, dass das Carbomergel viel dünnflüssiger als die Basiscreme ist. Darüber hinaus gehört die Wollwachsalkoholsalbe zu den dickflüssigen, viskosen Medien. In Übereinstimmung hiermit wurde die größte Spreitungsfähigkeit für das Carbomergel und die kleinste für die Wollwachsalkoholsalbe gefunden. Aus der Prüfung der Dichte ist ersichtlich, dass das Carbomergel die größte Dichte aufwies, gefolgt von der Basiscreme und der Wollwachsalkoholsalbe.

Rheologische Eigenschaften der Grundlagen

Die untersuchten Grundlagen unterscheiden sich deutlich in ihren rheologischen Eigenschaften. Deshalb wurden die rheologischen Untersuchungen bei den unterschiedlichen an jede Grundlage angepassten Bedingungen durchgeführt. Die Fließgrenze einer Zubereitung beeinflusst vor allem die Einfachheit der Dosierung (Entnahme aus der Tube) sowie ihre Applikation und Verteilung auf der Haut [Alberti et al. 2005]. Bei der Fließgrenzbestimmung wurde folgende Reihenfolge beobachtet:

Wollwachsalkoholsalbe> Basiscreme> Carbomergel.

Daraus ist es ersichtlich, dass die Struktur der Wollwachsalkoholsalbe stabiler gegenüber der Basiscreme und dem Carbomergel ist. Um die Wollwachsalkoholsalbe zum Fließen zu bringen, musste die größte Schubspannung im Vergleich zu zwei restlichen Grundlagen eingesetzt werden. Das Carbomergel beginnt am frühesten zu fließen. Eine ähnliche Reihenfolge resultiert auch aus den Bestimmungen der scheinbaren Viskosität der Grundlagen.

Anhand der Oszillationsmessungen konnte am ermittelten Phasenwinkel folgende Reihenfolge beobachtet werden:

Wollwachsalkoholsalbe> Basiscreme> Carbomergel.

Die Wollwachsalkoholsalbe zeigte von allen Zubereitungen den höchsten Phasenwinkel, was auf die geringste Dominierung der elastischen Eigenschaften im Vergleich zu der Basiscreme und dem Carbomergel hinweist.

Zwischen den Ergebnissen aus den Oszillationsmessungen und aus der Fließgrenzebestimmung besteht eine Diskrepanz. Der Phasenwinkel und die Fließgrenze einer Grundlage sind jedoch zwei unterschiedliche, unabhängige Größen.

Resümierend lässt sich sagen, dass die ermittelten rheologischen Parameter zur Erfassung der in der Grundlage eintretenden Änderungen sowohl nach der Lagerzeitprüfungen als auch nach der Wirkstoff- oder Permeationsenhancereinarbeitung benutzt werden können. Die scheinbare oder plastische Viskosität eines Grundlagentyps kann zu diesem Zweck verglichen werden. Detaillierte Einblicke in die Strukturänderung können vor allem Versuche zur Ermittlung von viskoelastischem Verhalten der Formulierungen geben.

Erwartungsgemäß stimmen die ermittelten rheologischen Eigenschaften mit den Ergebnissen aus der Konsistenzbestimmung überein. Das Carbomergel ist viel dünnflüssiger im Vergleich zu den beiden restlichen Grundlagen. Die Wollwachsalkoholsalbe ist dickflüssiger und viskoser als die Basiscreme.

Die rheologischen Eigenschaften der Matrix spielen eine große Rolle bei der diffusionsabhängigen Wirkstofffreisetzung, weil nach der verallgemeinerten Stokes-Einstein-Gleichung der Diffusionskoeffizient von der Viskosität der Grundlage abhängt. Gemäß dieser Gleichung wird erwartet, dass die Diffusion sich unabhängig vom Wirkstoff mit der ansteigenden Viskosität der Grundlage vermindert. Das somit erwartete Freisetzungsrang ist:

Carbomergel > Basiscreme > Wollwachsalkoholsalbe.

Bei der Entwicklung einer Formulierung müssen deren physikalische Eigenschaften, wie Konsistenz oder viskose Beschaffenheit, erfasst werden. Prinzipiell kann dies anhand sehr einfacher Methoden erfolgen. Hierzu zählen die Penetrometrie oder die Extensometrie. Rheologische Untersuchungen liefern jedoch eine deutlich genauere Charakterisierung der Grundlageneigenschaften und können daher wesentlich besser zur Prüfung herangezogen werden, um physikalische Änderungen in der Zubereitung während der Lagerung zu verfolgen.

Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich sagen, dass die Grundlage selbst einen großen Einfluss auf die therapeutische oder kosmetische Wirkung hat. Bei der Wahl der halbfesten Zubereitung sind zum einen die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs zu beachten, zum anderen müssen die physiologischen Aspekte, wie Hautzustand, Hauttyp und Lokalisation berücksichtigt werden. Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Grundlagenauswahl ist, dass die Hilfsstoffe eine befriedigende Stabilität und keine Inkompatibilitäten mit der aktiven Substanz aufweisen sollen. Die physikochemischen Parameter spielen eine entscheidende Rolle bei der Herstellung und Anwendung halbfester Zubereitungen. Zu ihrer Erfassung in der präklinischen Entwicklungsphase reicht jedoch eine der hier dargestellten Methoden. In Bezug auf den letztlich angestrebten niedrigen Substanzverbrauch sowie eine kurze Messzeit zur Erhebung der Daten wird die Viskositätsmessung zur Bestimmung der Fließgrenze und der plastischen Viskosität der Probe als eine einfache, schnelle und effiziente Methode vorgeschlagen.

6. Formulierungen und deren Charakterisierung

Im Rahmen der Kapitel 3 und 4 wurde die Charakterisierung der Modellsubstanzen und der Vehikel beschrieben. In diesem Kapitel wird der Zusammenhang zwischen der aktiven Substanz und der Grundlage behandelt. Als komplexe Einheit entscheidet die Formulierung über die Applikationseigenschaften, die Freigabe des Wirkstoffs und dessen Penetration in die Haut. Die halbfeste Zubereitung repräsentiert den Wirkstoffträger, der einerseits eine optimale Freisetzung der aktiven Substanz sowie deren Aufnahme in die Haut (falls erwünscht) gewährleisten soll. Andererseits muss die chemische, physikalische und mikrobiologische Stabilität der Formulierung garantiert werden.

Die Untersuchungen des Einflusses der Grundlage auf die Wirkstoffpermeation und –freisetzung standen somit im Vordergrund der Betrachtung. Parallel wurden Informationen über die Formulierungsstabilität erfasst. Zunächst erfolgte die Auswahl einer geeigneten Hautmembran für die Permeationsexperimente. Im Rahmen der Permeationsuntersuchungen wurden die Experimente zum überwiegenden Teil mit exzidierte Humanhaut in Diffusionszellen durchgeführt. Seit einigen Jahren sind auch rekonstruierte Hautmodelle kommerziell verfügbar. Da in sehr naher Zukunft (ab 2009) die Verwendung lebender Tiere für die Testung von Kosmetika nicht mehr gestattet sein wird, besteht ein großes Interesse nach geeigneten Alternativmethoden zur Untersuchung der Permeation und Penetration topisch applizierter Substanzen mittels dieser Modelle [Schäfer-Korting et al. 2006]. Daher wurde zusätzlich ein rekonstruiertes Hautmodell, Episkin[®], zur Erfassung der Wirkstoffpermeation geprüft.

6.1. Wirkstoffinkorporation

Die Wirkstoffinkorporation in die Grundlagen erfolgte manuell mittels einer Fantaschale und eines Pistills (näheres in Kap. 10.7.4). Für alle Testsubstanzen wurde eine Konzentration von 0,1% (m/m) in den Formulierungen angestrebt.

6.2. Wirkstoffzustand in der Zubereitung

Um entscheiden zu können, inwieweit es sich bei den gewählten Formulierungen um Suspensionsalben oder Lösungssalben handelt, werden die Zubereitungen lichtmikroskopisch auf die Anwesenheit von Kristallen untersucht (Methode im Kap. 10.13.1 beschrieben). Zu diesem Ziel wurden ebenfalls DSC-Messungen durchgeführt, die sich aber auf Grund des geringen Anteils an aktiver Substanz in der Formulierung als ungeeignet erwiesen.

Abb. 6.1 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen für das Carbomergel mit Koffein und Hydrocortison, sowie die Basiscreme und Wollwachsalkoholsalbe mit Hydrocortison.

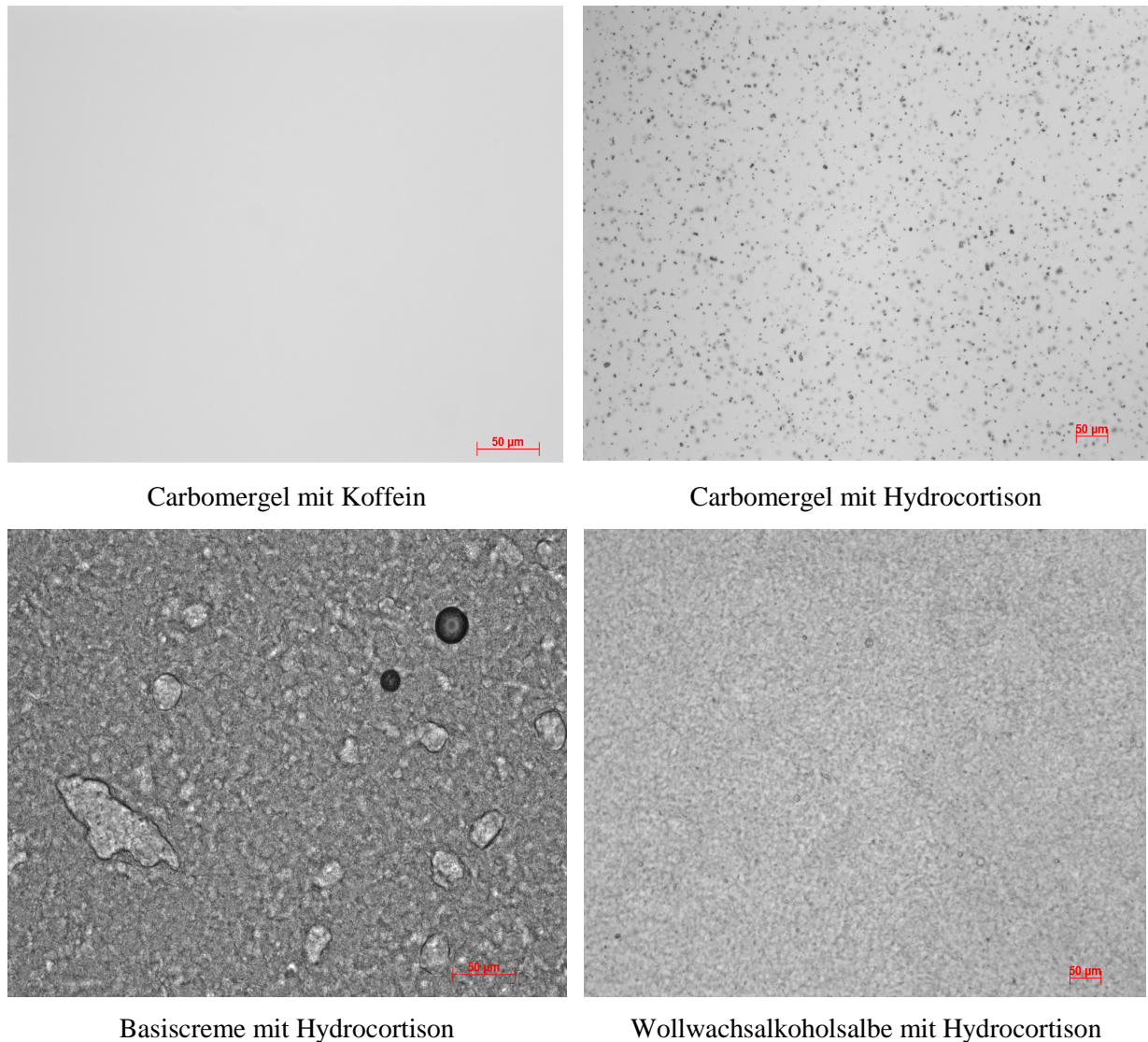


Abb. 6.1: Lichtmikroskopische Untersuchung der wirkstoffhaltigen Zubereitungen

Während in allen steroidhaltigen Carbomergelen eindeutig Kristalle zu identifizieren waren und dementsprechend Suspensionsgele vorlagen, waren in dem Gel keine Koffeinkristalle zu erkennen, was mit den Ergebnissen der Löslichkeitsbestimmungen in Einklang steht (siehe Kap. 4.2.2). In Basiscreme und Wollwachsalkoholsalbe konnten auf Grund der sehr komplexen Struktur dieser Grundlagen keine Kristalle detektiert werden. Somit kann keine nähere Aussage über den Wirkstoffzustand in diesen Zubereitungen getroffen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Hydrocortison und Betamethasonvalerat in der Wollwachsalkoholsalbe bei der Wirkstoffkonzentration von 0,1% eine Suspensionsalbe bilden [Refai und Müller-Goymann 2002, Mitriaikina und Müller-Goymann 2006]. Ein

ähnliches Verhalten wird somit auch im Falle der anderen Steroidmoleküle Testosteron, Mometasonfuroat und Clobetasolpropionat erwartet.

6.3. Freisetzung

Auf die Freisetzung der aktiven Substanz aus der Formulierung wurde bereits im Rahmen der im ersten Kapitel dargestellten Prozesse des Wirkstofftransports in die Haut eingegangen. Sie spielt die entscheidende Rolle für den ersten Schritt der Wirkstoffinvasion in die Haut.

Die Wirkstofffreigabe aus den Testformulierungen ist von der Art der Grundlage und deren Wechselwirkung mit dem Wirkstoff abhängig. Mit Hilfe den in vitro Liberationsuntersuchungen lassen sich diese Wechselwirkungen unbeeinflusst von möglichen Hauteffekten quantifizieren. Die Freisetzungsrates hängt überwiegend von der Löslichkeit des Wirkstoffs in der Grundlage und der Viskosität des Mediums bzw. der Formulierung ab, wobei die höchste Rate aus der Lösung zu erwarten ist. Aber auch die Konzentration der aktiven Substanz in der Grundlage und gegebenenfalls ihre Teilchengröße spielen eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Freisetzungsuntersuchungen aus den Testformulierungen nach Empfehlung der SUPAC-SS Guideline mit Hilfe der Franz-Diffusionszelle (Kapitel 10.10) [Guidance for Industry SUPAC-SS 1998, Guidance for Industry SUPAC-SS 1997]. Hier wird der Donor von der Akzeptorlösung durch eine synthetische Membran in zwei Kompartimente getrennt. Um ein angemessenes Freisetzungsprofil zu erzeugen und die Freisetzungsrates des Wirkstoffs zu bestimmen, sollte die verwendete Membran inert gegenüber dem Wirkstoff und dem Akzeptormedium sein. Es darf keine Adsorption des Wirkstoffes an die Membran erfolgen. Die Permeation durch die synthetische Membran sollte darüber hinaus nicht die Freisetzungsrates limitieren. Für die Corticosteroidfreisetzung aus lipophilen Salben wird empfohlen, die Membran vor dem Versuch für 30 Minuten in Isopropylmyristat zu quellen [Shah et al. 1991]. Isopropylmyristat verleiht der Membran auf diese Weise einen lipophilen Charakter, was die Diffusion des Wirkstoffs aus der lipophilen Phase erleichtert. Da die Freisetzungsversuche aus Gelen und Cremes keine Isopropylmyristat getränkte Membran benötigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf dieses Verfahren verzichtet. Somit wurde die Freisetzung aus allen Zubereitungen unter identischen Bedingungen untersucht.

Die Wirkstofffreisetzungsrates ist abhängig vom Wirkstoffkonzentrationsgradienten zwischen dem Vehikel und der Akzeptorphase. Für wasserlösliche Substanzen kann ein wässriger Puffer als Akzeptor verwendet werden. Für schlecht wasserlösliche Substanzen wird meistens ein Alkohol-Wasser-Gemisch verwendet. Für Corticosteroide wird empfohlen, als

Akzeptormedium ein IPM-Wasser-Ethanol Gemisch (10:5:85; v/v, %) für die Freisetzung aus Salben zu nutzen [Shah and Elkins 1995]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Experimente überwiegend mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (50:50; v/v, %) als Akzeptor durchgeführt (näheres in Kap. 10.10).

Die aufzutragende Testformulierungsmenge spielt bei der Freisetzung keine wesentliche Rolle. In der Literatur wurden Versuche mit variierenden Mengen von 0,2 bis 1 g der Formulierung beschrieben, wobei keine Unterschiede in dem Wirkstofffreisetzungsprofil festgestellt werden konnten [Shah et al. 1991].

Die Freisetzungscharakteristik eines Wirkstoffs und sein Konzentrationsprofil im Vehikel hängen davon ab, ob der Wirkstoff in Zubereitung komplett gelöst oder suspendiert vorliegt. Für eine einseitige Freisetzung aus planaren Systemen, bei denen die Konzentration des Wirkstoffes in der Matrix größer als die Sättigungskonzentration ist, wird allgemein die Beziehung von Higuchi angegeben [Higuchi 1961]:

$$Q = A \cdot \sqrt{D \cdot c_s \cdot (2 \cdot c_0 - c_s)} \cdot \sqrt{t} \quad \text{Gleichung 6.1}$$

Q	freigesetzte Wirkstoffmenge zur Zeit t [g]
A	Diffusionsfläche [cm ²]
D	Diffusionskoeffizient [cm ² /min]
c _s	Wirkstoffsättigungskonzentration in der Grundlage [g/mL]
c ₀	Wirkstoffkonzentration in der Matrix [g/mL]
t	Zeit [min]

Wenn eine deutlich größere Konzentration an suspendiertem Wirkstoff vorliegt ($c_s \ll c_0$), lässt sich diese Gleichung vereinfachen zu:

$$Q = A \cdot \sqrt{2 \cdot D \cdot c_s \cdot c_0} \cdot \sqrt{t} \quad \text{Gleichung 6.2}$$

Bei einer Wirkstoffkonzentration in der Grundlage, die etwa der Sättigungskonzentration in der Grundlage entspricht ($c_0 \rightarrow c_s$), führt die Gleichung 6.2 zu einem Fehler von bis zu 11,3% Abweichung vom exakten Wert [Renner 2003].

Die Gleichungen 6.1 und 6.2 beschreiben eine lineare Beziehung zwischen der kumulativen Menge freigesetzten Wirkstoffs und der Wurzel der Zeit. Somit ergibt bei der Auswertung die Auftragung der Menge des freigesetzten Wirkstoffes pro Fläche (µg/cm²) über die Wurzel der Zeit eine Gerade. Die Steigung der Regressionsgerade stellt die Freisetzungsrate der Formulierung dar und lässt sich aus der folgenden Gleichung berechnen:

$$St = \frac{dQ}{A \cdot \sqrt{dt}}$$

Gleichung 6.3

Die nach 6 h aus den drei Formulierungen freigesetzte Menge der Modellschubstanzen ist in Tab. 6.1 zusammengefasst.

Tab. 6.1: Wirkstofffreigesetzte Menge aus den Testformulierungen nach 6 Stunden, n=6, MW ± SD

Wirkstoff	Freigesetzte Menge nach 6 Stunden [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]		
	Basiscreme	Wollwachsalkoholsalbe	Carbomergel
Betamethasonvalerat	41,17 ± 2,78	17,49 ± 0,99	147,00 ± 6,53
Clobetasolpropionat	32,68 ± 1,36	15,12 ± 1,00	139,80 ± 3,71
Hydrocortison	57,74 ± 2,34	4,52 ± 0,44	163,42 ± 13,75
Mometasonfuroat	17,43 ± 0,92	4,12 ± 0,29	58,92 ± 1,09
Testosteron	64,26 ± 1,78	40,26 ± 2,28	144,68 ± 6,13
Koffein	107,56 ± 3,59	24,17 ± 1,68	168,24 ± 11,09

Als Beispiel wird die Freisetzung von Hydrocortison aus der Basiscreme graphisch dargestellt (Abb. 6.2).

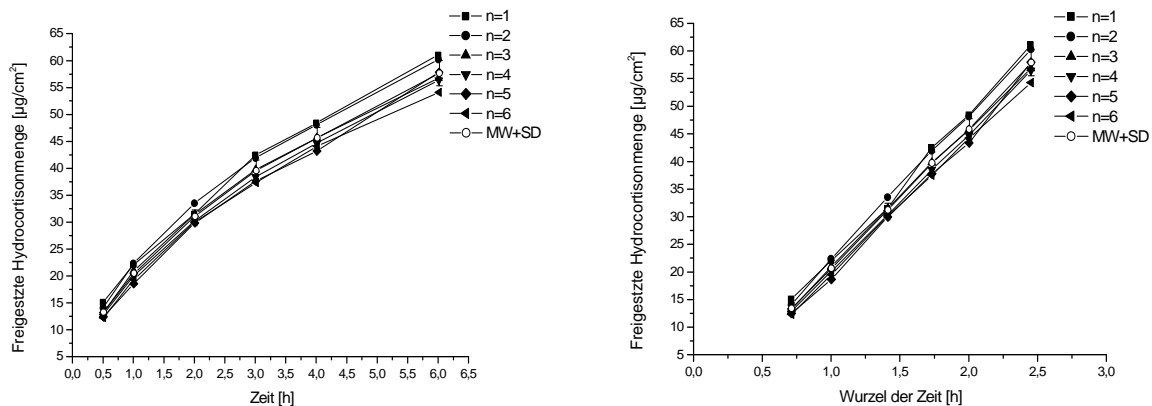


Abb. 6.2: Freisetzung von Hydrocortison aus der Basiscreme, links: x-Achse Zeit, rechts: x-Achse Wurzel der Zeit, n=6

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Wirkstofffreisetzung aus den halbfesten Zubereitungen formulierungsspezifisch verläuft. Während beim Carbomergel schnell das höchste Ausmaß erreicht wird, zeigen Creme und Salbe zunächst eine verzögerte Freisetzung, die jedoch mit der Zeit langsam dem Maximalwert zustrebt. Die beobachtete Reihenfolge der Freisetzungsrates aus den Formulierungen war für alle Wirkstoffe gleich:

Carbomergel >> Basiscreme > Wollwachsalkoholsalbe.

Eine große Rolle bei der diffusionsabhängigen Wirkstofffreisetzung spielen die rheologischen Eigenschaften der Matrix, weil der Diffusionskoeffizient von der Mikroviskosität der Grundlage nach der verallgemeinerten Stokes-Einstein-Gleichung abhängt:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{Gleichung 6.4}$$

D	Diffusionskoeffizient
k	Boltzmannkonstante
T	absolute Temperatur
η	Viskosität
r	Radius des kugelförmigen Partikels

Gemäß dieser Gleichung wird erwartet, dass die Diffusion sich mit einer ansteigenden Viskosität vermindert. Die Ergebnisse aus der Freisetzungsuntersuchungen bestätigen diesen großen Einfluss der Viskosität der Grundlage auf die Wirkstoffliberation. Für alle Wirkstoffe verläuft die Liberation mit größter Geschwindigkeit aus dem dünnflüssigen Carbomergel. Csoka et al. haben ebenfalls eine sehr schnelle Freisetzung mit einem „burst effect“ aus einem Hydrogel beobachtet [Csoka et al. 2005]. Die langsamste Freisetzung wurde gemäß der Erwartungen aus der hochviskosen Wollwachsalkoholsalbe beobachtet. Die einfache Differenzierung auf Grund der Unterschiede in der Viskosität ist wegen der komplexen Grundlagenstruktur jedoch nicht immer möglich, was Auner und Valenta beobachteten [Auner und Valenta 2003]. Bei der Freisetzung aus der Basiscreme läßt sich zusätzlich ein Effekt der Molekülgröße feststellen. Gemäß Gleichung 6.4 werden mit steigender Molmasse der Modellschubstanzen kleinere Freisetzungsraten beobachtet. Dies trifft allerdings für die Liberation aus der Wollwachsalkoholsalbe und dem Carbomergel nicht zu. Im Einklang mit Literaturdaten, war die Koffeinfreisetzung aus allen Formulierungen sehr rasch und es konnten nur sehr kurze Lag Phasen detektiert werden [Dias et al. 1999].

Das Vorhandensein der Membran bei den Liberationsversuchen verursacht eine begrenzte Verzögerung, bevor der Wirkstoff im Akzeptormedium nachgewiesen werden kann. Bei der Freisetzung aus Wollwachsalkoholsalbe und Basiscreme wurde daher in allen Fällen eine Lag Phase beobachtet.

Das eine von der Membran unbeeinflusste Wirkstoffliberation vorliegt, ist mit Hilfe der Auftragung nach Higuchi überprüfbar. Unabhängig von dem Zustand des Arzneistoffes (suspendiert oder gelöst) ergeben sich bei allen getesteten Wirkstoffen und Zubereitungen Geraden mit Korrelationskoeffizient zwischen 0,9753-0,9990 (Wollwachsalkoholsalbe), 0,9852-0,9999 (Basiscreme) und 0,9126-0,9945 (Carbomergel).

Rückblickend muss bei den ermittelten Ergebnissen eine mögliche Diffusion des Akzeptormediums durch die Membran berücksichtigt werden. Dies kann nicht ausgeschlossen werden, da poröse Membranen, wie die hier verwendete Dialysemembran, den Wassertransport aus dem Akzeptormedium in Richtung Vehikel nicht vollständig verhindern können [Nicoli et al. 2005]. Daraus resultierende Interaktionen mit den untersuchten Grundlagen und insbesondere mit dem Carbomergel könnten die Freisetzungskinetik beeinflussen. Eine solche Diffusion des Akzeptormediums in das Gel kann eine Änderung des pH-Wertes innerhalb der Zubereitung bewirken sowie sich auf die Struktur des Gels und somit auf seine Viskosität auswirken.

6.4. Permeationsuntersuchungen

Zielsetzung der Permeation ist die Erstellung eines kinetischen Profils, welches die Quantität und die Geschwindigkeit, mit der ein Wirkstoff durch die Haut diffundiert, wiedergibt. Da der Einsatz unterschiedlicher Zubereitungen zu entsprechend unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten bei einem Wirkstoff führt, sollten unter diesen Bedingungen daraus auch unterschiedliche Permeabilitäten für diesen Wirkstoff resultieren [Liesen 2003]. Der Formulierungs- und auch der Wirkstoffeinfluss auf die Permeation über humane Haut sollten hier näher untersucht werden. Die Untersuchungen wurden mit dem etablierten Modell der Franz-Zelle unter Variation der verwendeten Hautbarriere durchgeführt. Als Membranen wurden dermatomisierte Humanhaut, hitzeseparierte Humanepidermis und das rekonstruierte Hautmodell Episkin[®] untersucht. Alle Experimente wurden unter Infinite-dose-Bedingungen (ca. 100 mg Formulierung pro cm² Diffusionsfläche) durchgeführt (Kapitel 10.12).

Die Löslichkeit der Testsubstanz im Akzeptor darf nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Permeation sein. Deshalb ist es notwendig, bei den Permeationsversuchen mit den Steroiden, die sehr schwer löslich oder praktisch unlöslich in wässriger Lösung sind, einen Lösungsvermittler zu verwenden, um die entsprechende Löslichkeit zu gewährleisten. Die OECD Guideline empfiehlt zu diesem Ziel die Zugabe von max. 5% BSA in die Akzeptorlösung [OECD 2004]. Schreiber et al. waren in der Lage nachzuweisen, dass die Zugabe von 5% BSA in das Akzeptormedium keinen Einfluss auf die Permeation eines hydrophilen Wirkstoffs wie Koffein hat [Schreiber et al. 2005]. In Gegenwart von 5% BSA in der Akzeptorlösung stellten sie für das Testosteron eine mehr als doppelt so hohe Permeationsrate als ohne BSA fest. In eigenen Untersuchungen wurde der Anteil von BSA im Akzeptor aus analytischen Gründen auf 1% reduziert. Im Rahmen von Vorversuchen zum Einfluss des Lösungsvermitlers im Akzeptor auf die Permeation von Testosteron und Koffein,

deren Resultate hier nicht dargestellt werden, konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von 1% BSA in den Akzeptor keinen signifikanten Einfluss auf die Permeation hat.

6.4.1. Hautmembranauswahl

In jüngerer Zeit erschienen mehrere Publikationen, die sich der Entwicklung, Evaluierung und Validierung von in vitro Untersuchungen widmen. Im Dezember 2000 hat die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) Entwürfe von Richtlinien für entsprechende in vitro und in vivo Untersuchungen ebenso wie nähere Ausführungen dazu publiziert. Für die Testung der kutanen Resorption wurde im November 2002 von der OECD eine Richtlinie verabschiedet, die alternativ zum Tierexperiment Resorptionsstudien an exzidierte vitaler Ratten-, Schweine- oder Humanhaut empfiehlt. Angesichts der Risikoabschätzung für den Menschen favorisiert die OECD Untersuchungen an Humanhaut. Auf Grund der größten Ähnlichkeit bei der Verwendung der exzidierten Humanhaut mit in vivo Bedingungen wurde diese im Rahmen dieser Arbeit für die vorgesehenen in vitro Permeationsversuche bevorzugt. Beim Einsatz von Humanhaut in den in vitro Absorptionsversuchen kommen grundsätzlich vier Membrantypen in Frage: die Vollhaut, dermatomisierte Haut, Epidermis und das isolierte Stratum corneum. Die Unterschiede beim Wirkstofftransport über diese unterschiedlichen Membrantypen können durch die voneinander abweichende Dicke der Hautschichten und damit variierende Diffusionsstrecke zustande kommen [Wagner 2001]. Neben der unterschiedlichen Diffusionsstrecke hat die Polarität der einzelnen Hautschichten ebenfalls einen beträchtlichen Einfluss auf die Wirkstoffdiffusion, was insbesondere im Falle der Steroide eine wichtige Rolle spielt. In eigenen Untersuchungen konnte für Koffein und Testosteron bereits gezeigt werden, dass die Permeation aus wässrigen Lösungen durch unterschiedliche Hautmembranen wie dermatomisierte Haut, hitzeseparierte Epidermis und trypsinisoliertes Stratum corneum mit vergleichbarer Geschwindigkeit in Abhängigkeit von Substanzeigenschaften erfolgt [Netzlaff et al. 2006a]. Bei Verwendung von Vollhaut konnte jedoch wegen der Hydrophilie der tieferen Hautschichten nach 24-stündiger Inkubation kein Testosteron im Akzeptor nachgewiesen werden. Analoge Testserien wurden von Bock et al. durchgeführt [Bock et al. 2002]. Sie haben unabhängig von der Hautdicke, wenn Vollhaut, dermatomisierte Haut, hitzeseparierte Epidermis oder trypsinisoliertes Stratum corneum als Testmembran verwendet wurden, vergleichbare P_{app} -Werte für Koffein aus einer Lösung und aus einer Salbe beobachtet.

Die humane Epidermis ist eine von der Guideline empfohlene Membran zur Untersuchung der in vitro Hautpermeation [OECD 2004, Sanco 2004]. Ein großer Vorteil dieser Membran

gegenüber der Vollhaut liegt darin, dass bei Anwendung von Vollhaut lipophile Substanzen oft in der Dermis verbleiben, anstatt in den Akzeptor zu gelangen [Netzlaff et al. 2006a]. Dies ist besonders wichtig bei den hier ausgewählten Modellschubstanzen. Dagegen spricht, dass hitzeseparierte Epidermis eine sehr leicht zu beschädigende Barriere ist, deren Handhabung relativ schwierig ist. Die Membrangewinnung ist in Kapitel 10.11.1 beschrieben. Die Hitzeseperation basiert auf einer definierten Hitzebehandlung und dient zur Gewinnung von Epidermisstücken. Dieses Verfahren ist die in der Literatur am häufigsten genannte Methode zur Trennung von Epidermis und Dermis. Es wurde nachgewiesen, dass eine 2-minütige Inkubation von Hautstücken in Wasser, welches auf 60 °C temperiert ist, keinen signifikanten Einfluss auf die Hautpermeabilität hat [Pitman and Rostas 1982]. Die Hitzeseperation zur Gewinnung von Epidermismembranen für in vitro Permeationsversuche wird ebenfalls durch die OECD empfohlen [OECD 2004]. Im Rahmen der Vorversuche zur Membranauswahl, deren Ergebnisse hier nicht präsentiert sind, konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von dermatomierter Haut und hitzeseparierter Epidermis für Testosterone vergleichbare Transportraten und Permeationskonstanten aus den hier getesteten Formulierungen liefert. Generell konnten beim Transport über hitzeseparierte Epidermis kürzere Lag Phasen (ca. 2 h) festgestellt werden als im Fall der dermatomierten Humanhaut (ca. 3 h). Auf Grund der in den Vorversuchen erhobenen Daten an hitzeseparierter Epidermis, die durch eine gute Reproduzierbarkeit und kleine Datenstreuung charakterisiert waren, wurde diese Membran für die weiteren Permeationsversuche mit den Testformulierungen verwendet. Hitzeseparierte Epidermis wurde ferner auf Grund zweier weiterer Vorteile ausgewählt: auf Grund der Einfachheit der Vorbereitungsmethode und auf Grund des ökonomischen Umgangs mit der Haut bei deren Präparation, können an einem Hautstück viele Formulierungen verglichen und eine intervariable Streuung vermieden werden.

Das zur OECD-Richtlinie No. 428 zugehörige Guidance Document No. 28 weist ebenfalls auf kommerziell verfügbare Humanhautmodelle hin, fordert aber den Nachweis der Vergleichbarkeit der Absorption bei der Testung an Hautmodellen und an Humanhaut oder tierischen Häuten [OECD 2004]. Humanhautäquivalente werden inzwischen von mehreren Herstellern in hoher Qualität angeboten. Die beste Dokumentation liegt für die Modelle EpiSkin, EpiDerm und SkinEthic vor [Netzlaff et al. 2005]. Bisher wurden rekonstruierte humane Hautmodelle verschiedener auf dem Markt zugänglicher Anbieter hinsichtlich der Lipidzusammensetzung charakterisiert und mit Humanhaut verglichen [Netzlaff et al. 2006]. Zur Zeit werden die Hautmodelle zur Erfassung möglicher korrosiver/irritativer Schäden [Kandarova et al. 2005 und 2006], sowie der Prüfung auf Phototoxizität eingesetzt [Netzlaff et

al. 2005]. Erst in letzter Zeit wurde in Deutschland eine Validierungsstudie durchgeführt, deren Ziel die Etablierung dieser Modelle bei den in vitro Absorptionsuntersuchungen ist [Schäfer-Korting et al. 2006 und 2007]. Die Entwicklung auf dem Hautmodellsektor schreitet stetig voran. Aus diesem Grund wurde hier überprüft, ob rekonstruierte Hautmodelle bei der Entwicklung halbfester Zubereitungen vorteilhaft eingesetzt werden können.

6.4.2. Über hitzeseparierte Humanhaut

Permeationsuntersuchungen ermöglichen die Bestimmung des transdermalen Transportes zu untersuchender Wirkstoffe aus der Formulierung. Hierzu wurden die in vitro Permeationskinetiken von den Wirkstoffen aus den drei Testformulierungen über einen Zeitraum von mindestens 25 Stunden über zwei hitzeseparierte humane Häute unterschiedlicher Spender bestimmt (Kapitel 10.12.2). Die Ergebnisse des Wirkstofftransports über die hitzeseparierten Häute 218-01-1005 und 221-01-1105 sind für alle untersuchte Testsubstanzen in Abb. 6.3 zusammengefasst.

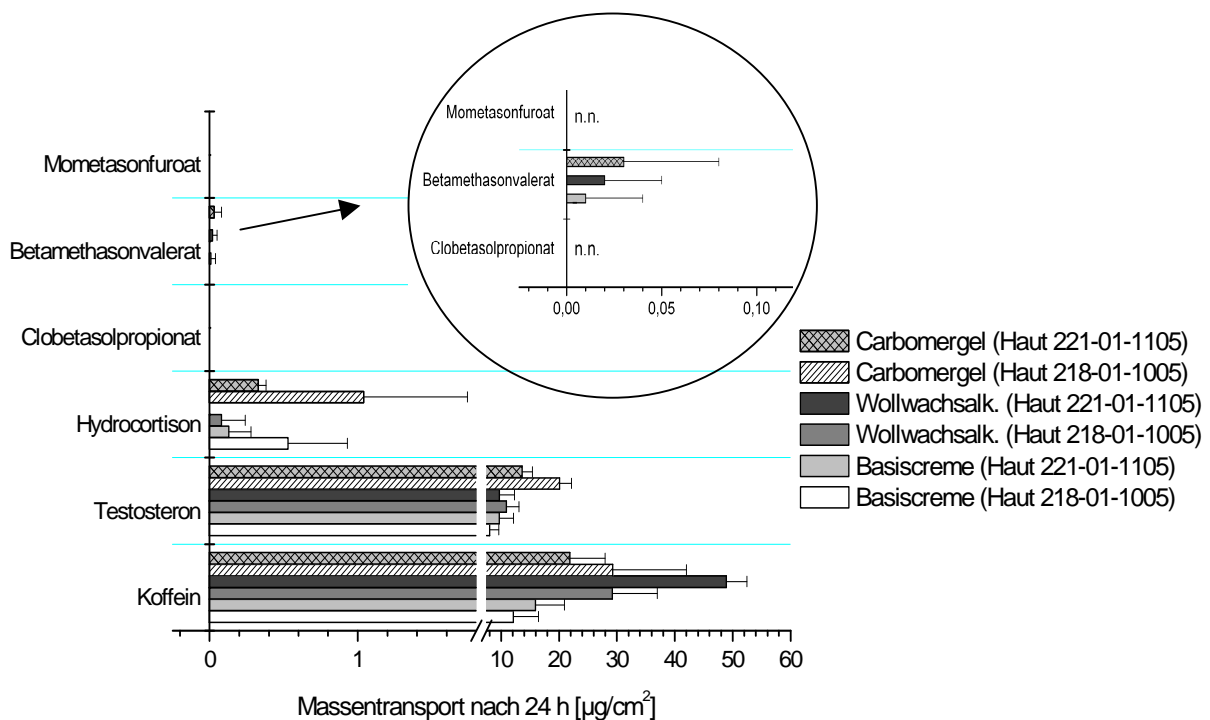


Abb. 6.3: Wirkstofftransport nach 24 h aus den Testformulierungen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=4).

Als Beispiel wurde der Transport von Testosteron über die hitzeseparierte Haut 218-01-1005 in Abb. 6.4 graphisch dargestellt.

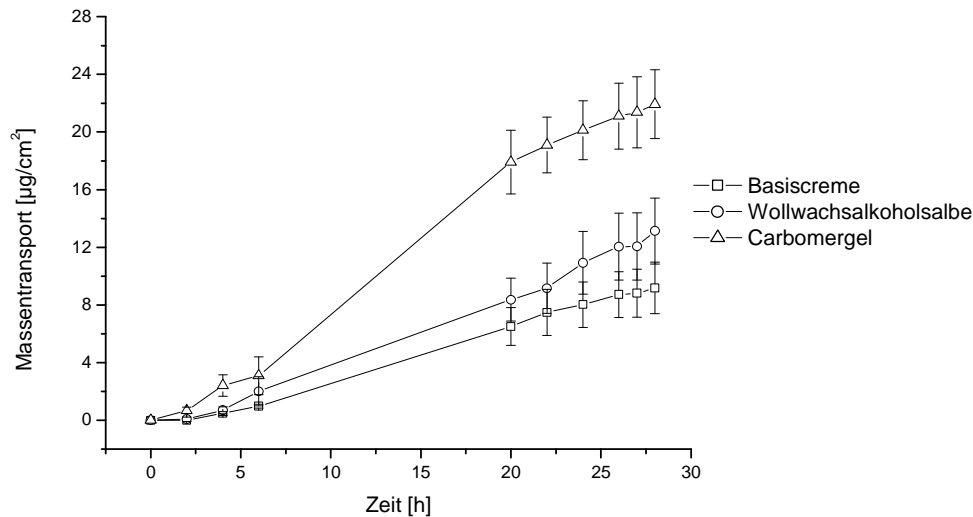


Abb. 6.4: Massentransport von Testosteron aus den Testformulierungen über die hitzeseparierte humane Haut 218-01-1005. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n=4).

Als Hautmembran wurde bei den *in vitro* Permeationsexperimenten die hitzeseparierte Epidermis von zwei unterschiedlichen Probanden eingesetzt. Man konnte für den Wirkstofftransport eine leichte Variabilität über die beiden getesteten Häute beobachten. Es lässt sich allerdings nicht verallgemeinernd sagen, dass eine dieser Membranen für alle Wirkstoffe permeabler als die andere war, obwohl kleine Unterschiede in der Epidermisdicke nach der Präparation festgestellt wurden.

Die höchste Permeationsrate wurde für den hydrophilsten Wirkstoff, das Koffein, beobachtet. Testosteron permeierte im Vergleich zu Koffein ca. zweimal langsamer. Hydrocortison diffundiert mit einer um den Faktor 10 niedrigeren Geschwindigkeit als Koffein aus den analysierten Grundlagen. Bei den Wirkstoffen Clobetasolpropionat und Mometasonfuroat wurde innerhalb einer Inkubationszeit von mindestens 30 Stunden kein Transport in den Akzeptor festgestellt. Im Gegensatz dazu wurden kleine Mengen von Betamethasonvalerat bei der Permeation über die hitzeseparierte Epidermis 221-01-1105 im Akzeptromedium nachgewiesen (allerdings erst nach 22-stündiger Inkubation).

Der Vergleich der aus den Permeationsuntersuchungen resultierenden Ergebnisse mit den Daten aus der Literatur gestaltet sich oft sehr schwierig. Der Grund dafür liegt in unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie z.B. der Verwendung von unterschiedlichen Membranarten, von Membran unterschiedlicher Spendern oder von unterschiedlich konzentrierten Donoren.

El-Kattan et al. haben im Vergleich zu eigenen Untersuchungen einen höheren Transport von Hydrocortison ($4,5$ bzw. $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) aus einem 2%-Suspensionsgel über Mausvollhaut beobachtet [El-Kattan et al. 2000, El-Kattan et al. 2001]. Ihre Untersuchungen an vier Wirkstoffen unterschiedlicher Lipophilie zeigten folgenden Zusammenhang zwischen Log P-Wert und Permeation: je höher die Lipophilie des untersuchten Wirkstoffs ist, desto niedriger wird seine Permeation über die Haut.

Der Transport von Koffein aus den Testformulierungen war vergleichbar mit anderen für diese Substanz publizierten Daten, wobei unterschiedliche Donormedien und Hautmembranen untersucht wurden [Akomeah et al. 2004, Bock et al. 2002, Monti et al. 2001]. Dias et al. beobachteten eine höhere Permeationsrate für Koffein [Dias et al. 1999]. In ihrer Studie wurden aber Formulierungen mit höher Konzentration (3% Koffein) verglichen.

Betamethason-17-Valerat wird in der Haut zum C_{21} -Ester metabolisiert, der weiter zu dem unveresterten Betamethason hydrolysiert wird [Gysler et al. 1999 a, Lange et al. 1997]. Gysler et al. haben während der Permeationsuntersuchung von Betamethason-17-Valerat aus halbfesten Formulierungen im Akzeptormedium sowohl Betamethason-17-Valerat als auch Betamethason-21-Valerat detektiert. In den eigenen Untersuchungen konnte im Akzeptor zum überwiegenden Teil Betamethason-17-Valerat und nur eine sehr kleine Menge Betamethason-21-Valerat ($< 10\%$) gefunden werden. Der Permeabilitätskoeffizient für Betamethasonvalerat aus der Wollwachsalkoholsalbe betrug ca. $4,21\text{E}-08 \text{ cm/s}$. Eine ähnliche Transportgeschwindigkeit von $6,65\text{E}-09 \text{ cm/s}$ beobachtete auch Mitriaikina bei ihren in vitro Transportversuchen aus der gleichen Grundlage und bei gleicher Wirkstoffkonzentration über humanes Stratum corneum [Mitriaikina and Müller-Goymann 2006]. Allerdings wurde hier im Akzeptor nicht Betamethasonvalerat sondern Betamethason detektiert. Der Grund dafür könnte die Verwendung unterschiedlicher Akzeptorpuffer sein. Durch die in dieser Arbeit erfolgte Zugabe von 1% BSA zum Puffer kam es wahrscheinlich zum unvollständigen Abbau von Betamethasonvalerat, wie Haberland et al. in analoger Weise bei Permeationsexperimenten mit Prednicarbat in Gegenwart von 5% BSA im Akzeptormedium festgestellt haben [Haberland et al. 2006]. Billich et al. haben einen Flux von ca. $0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ für Betamethasonvalerat und Clobetasolpropionat bei Permeationsversuchen über dermatomisierte humane Haut gefunden [Billich et al. 2004], wobei ihnen eine 10mal höher konzentrierte Lösung (1%ige Lösung in einem Gemisch von Propylenglycol und Oleylalkohol, 9:1) als die Testformulierungen in dieser Arbeit als Donor diente. Bei ihren Untersuchungen haben sie die größten Wirkstoffmengen in der Haut lokalisiert (ca. $70 \mu\text{g}$ von Betamethasonvalerat und $50 \mu\text{g}$ von Clobetasolpropionat pro g Haut). Fang et al. konnten

ebenfalls nur sehr kleine Permeationsraten von Clobetasolpropionat nachweisen [Fang et al. 1999]. Sie haben nach acht Stunden weniger als $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ im Akzeptor, einem Ethanol-Puffergemisch (3:7; v/v, %), gefunden. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen ebenfalls Mueller et al. [Mueller et al. 2003]. Sie konnten im Akzeptormedium ca. $0,31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach 32-stündiger Inkubation nachweisen. Sehr kleine Absorptionsraten für Clobetasolpropionat aus zwei Formulierungen mit 0,05% Wirkstoff ($2\text{--}3 \text{ ng}/\text{cm}^2/\text{h}$) wurden ebenfalls von Franz et al. beobachtet [Franz et al. 2003].

Sehr lipophile Arzneistoffe, zu denen die Corticosteroide gehören, bilden in der Hornschicht ein Depot, aus dem die Verteilung in das hydrophilere Milieu der Epidermis und Dermis nur langsam erfolgt [Schaper 2003]. Die große Molmasse und die sehr hohe Lipophilie von Clobetasolpropionat, Mometasonfuroat und Betamethasonvalerat können die Ursache für den vernachlässigbaren transdermalen Transport über die untersuchten Häute sein. Es ist allgemein bekannt, dass eines der möglichen Verfahren, um die systemische Absorption eines topischen Wirkstoffs zu reduzieren, auf der Erhöhung seiner Lipophilie z.B. durch die Esterifizierung der Corticosteroide basiert [Brazzini and Pimpinelli 2002].

Die Bestimmung des transdermalen Transportes war für einige der analysierten Corticosteroide, Mometasonfuroat und Clobetasolpropionat, nicht möglich. Die Untersuchung des Penetrationsprofils scheint hier sinnvoller zu sein, um den Einfluss der Formulierung auf den Wirkstofftransport über die Haut näher untersuchen zu können.

6.4.3. Vergleich der Testosteronpermeation aus den drei Grundlagen über das Episkin-Modell und über dermatomisierte Humanhaut

Heutzutage sind rekonstruierte menschliche Epidermismodelle, die das native menschliche Gewebe hinsichtlich Morphologie, Differenzierungsmerkmalen und Lipidzusammensetzung abbilden, kommerziell erhältlich. Experimentelle Verfahren zur Testung von Korrosivität und Phototoxizität sind entwickelt und validiert [Netzlaff et al. 2005]. Um zu prüfen, ob die rekonstruierten Hautmodelle bei der Entwicklung halbfester Formulierungen eingesetzt werden können, wurde der Transport einer Modellschubstanz, Testosteron, über ein Epidermismodell und über dermatomisierte humane Haut verglichen. Für dieses Ziel wurde das Episkin®-Modell (J13, $1,07 \text{ cm}^2$, Firma L'Oreal, Frankreich) käuflich erworben. Die Experimente an der rekonstruierten Haut wurden über ein kürzeres Zeitintervall von 9 Stunden betrachtet, um die Lebensfähigkeit der Zellen aufrecht zu erhalten.

Die bestimmten Lag Phasen und die mittleren Permeationskoeffizienten aus den Testformulierungen über die dermatomisierte humane Haut 193-01-1204 und über das Episkin-Modell Charge 05-EPIS-014 sind in Tab. 6.2 dargestellt.

Tab. 6.2: Testosterontransport über dermatomisierte Humanhaut 193-01-1204 und über Episkin

Formulierung	Lag Phase [h]		P_{app} MW \pm SD [cm/s]	
	Dermat. Haut	Episkin	Dermat. Haut	Episkin
Basiscreme	2,99	0,03	$1,45 \pm 0,26E-07$	$6,40 \pm 0,46E-07$
Wollwachsalkoholsalbe	3,28	0,01	$1,71 \pm 0,28E-07$	$6,31 \pm 0,73E-07$
Carbomergel	2,97	0,07	$2,40 \pm 0,30E-07$	$1,18 \pm 0,12E-06$

Der Massentransport über diese beiden Membranen wird graphisch in Abb. 6.5 verglichen.

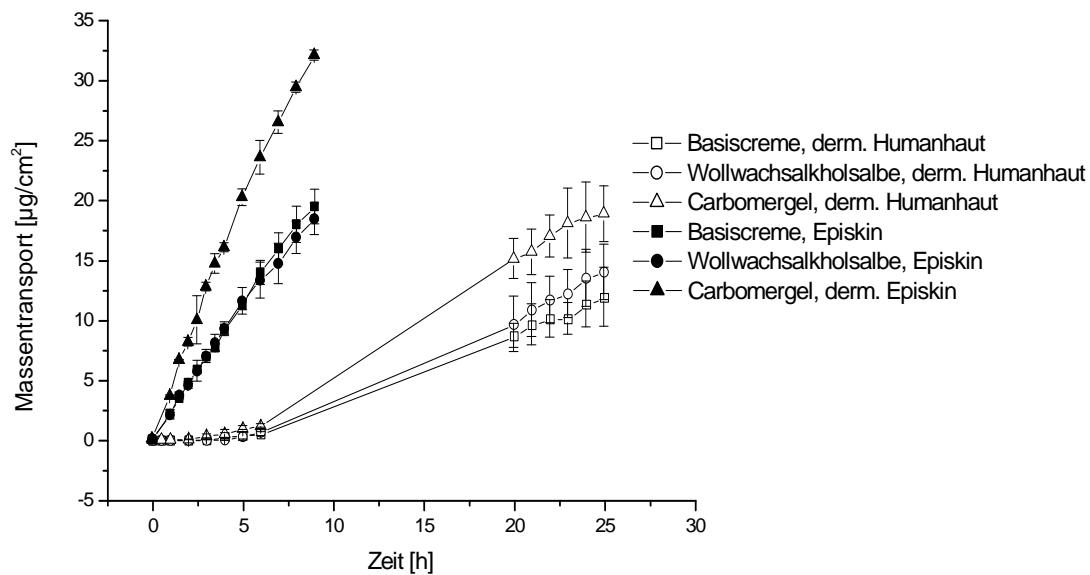


Abb. 6.5: Testosteronpermeation aus den Testformulierungen über dermatomisierte humane Haut 193-01-1204 und über Episkin Charge 05-EPIS-014

Generell findet der Testosterontransport über das Episkinmodell schneller als über dermatomisierte humane Haut statt. Die Ergebnisse zeigen somit deutlich, dass die Barrierefunktion des getesteten Hautmodells weniger ausgeprägt ist als bei normaler menschlicher Haut. Für die dermatomisierte Humanhaut konnte eine Lag Phase von ca. 3 h ermittelt werden. Für das Epidermismodell Episkin® konnte im Gegensatz dazu nur eine sehr kurze Lag Phase (unter 0,5 h) beobachtet werden. Das an dermatomierter Humanhaut und dem rekonstruierten Hautmodell erhaltene Permeationsranking ist jedoch gleich. Für beide untersuchten Membranen wurde die höchste Testosteronpermeationsrate für das Carbomergel beobachtet, was mit den vorher beschriebenen Ergebnissen aus den in vitro Permeationsuntersuchungen über hitzeseparierte Epidermis übereinstimmt. Die Basiscreme zeigte eine der Wollwachsalkoholsalbe vergleichbare in vitro Permeationsrate.

6.4.4. Vergleich mit anhand von in silico Modellen vorhergesagten P_{app} -Werten

Für alle Formulierungen wurden die mittleren P_{app} -Werte (in Tab. 6.3) mit den Permeabilitätskoeffizienten verglichen, die anhand der Potts & Guy und Wilschut Gleichung vorhergesagt wurden, was genauer in Kapitel 4.3 beschrieben wird.

Tab. 6.3: Vergleich der experimentell gewonnen Permeabilitätskoeffizienten mit den nach der Korrelation von Potts und Guy vorhergesagten Permeabilitätskoeffizienten

Wirkstoff		P_{app} -MW · 10^7 für alle Formulierungen [cm/s]	P_{app} · 10^7 aus der Gleichung von [cm/s]	
			Potts & Guy	Wilschut
Betamethasonvalerat	BV	0,40*	5,40	5,46
Clobetasolpropionat	CP	-	5,16	5,13
Hydrocortison	HC	0,09	0,40	0,49
Mometasonfuroat	MF	-	1,40	1,98
Testosteron	TE	1,62	22,30	13,71
Koffein	KF	3,02	0,29	0,41

* berechnet nur aus drei Punkten im linearen Bereich

In Bezug auf die in Tab. 6.3 dargestellten Ergebnisse zeigt sich folgendes „Ranking“ der anhand der in silico Modelle vorgesehenen Permeationsgeschwindigkeit für analysierte Wirkstoffe:

TE > BV > CP > MF > HC > KF

Im Gegensatz dazu ergibt sich aus den experimentellen Untersuchungen das nachstehende „Ranking“ der Permeationsgeschwindigkeit:

KF > TE > BV > HC >> MF = CP

Die nach Potts & Guy und Wilschut Gleichungen berechneten Permeabilitätskoeffiziente sind nicht prädikativ für die Transportgeschwindigkeit der in dieser Arbeit angesetzten Modellschubstanzen über die Haut. Dabei ist zu bedenken, dass diese Modelle den transdermalen Transport aus einer Lösung und nicht aus Formulierungen beschreiben. Der Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient determiniert in beiden Rechenmodellen die Permeationsgeschwindigkeit. Für die Corticosteroide, die zu den stark lipophilen Wirkstoffen gehören, werden auf diese Weise sehr hohe Permeabilitätskoeffizienten berechnet, was allerdings nicht der Realität entspricht. Es ist bekannt, dass viele Substanzen mit hohem Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten ein Depot im lipophilen Stratum corneum bilden und dass sie nicht oder nur in sehr kleinem Ausmaß in tiefere Hautschichten transportiert werden [Potard 2000].

6.5. Einfluss der Freisetzungsgeschwindigkeit auf die Permeation

Die Freisetzungsrates aus den Zubereitungen wird überwiegend von der Mikroviskosität der Grundlage bestimmt. Alle Wirkstoffe wurden in der gleichen Reihenfolge aus den verwendeten Grundlagen freigesetzt, wobei die Freisetzung aus dem dünnflüssigen Carbomergel mit höchster Geschwindigkeit und aus der höher viskosen Wollwachsalkoholsalbe mit der niedrigsten Geschwindigkeit erfolgte. Die Permeationsergebnisse liefern ein Transportranking, das nicht dem Freisetzungsrating entspricht (Tab. 6.4).

Tab. 6.4: Liberation- und Permeationsranking aus den Experimenten über die HSE

Wirkstoff	Liberation	Permeation
Betamethasonvalerat	C>>B>W	C>>W>B
Clobetasolpropionat	C>>B>W	n.q.
Hydrocortison	C>>B>W	C>>B>W
Mometasonfuroat	C>>B>W	n.q.
Testosteron	C>>B>W	C>>W>B
Koffein	C>>B>W	W>>C>B

Beim Hauttransport spielen die Stoffeigenschaften und Wechselwirkungen der Grundlage mit der Haut eine bedeutsame Rolle. Aus den Ergebnissen ist offensichtlich, dass die Stofffreisetzung aus der Grundlage nicht der limitierende und der entscheidende Schritt des gesamten Permeationsprozesses ist. Die Aufnahme eines Wirkstoffs aus einer Grundlage in die Haut ist deutlich komplizierter und komplexer und lässt sich nicht immer anhand der Freisetzungsversuche vorhersagen. Dias et al. konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen der in vitro Freisetzung von Koffein aus drei kommerziellen Formulierungen und dem Transport durch die Haut finden [Dias et al. 1999]. Die folgende Tendenz kann bei der Stoffaufnahme in die Haut auf Grund der erhobenen Ergebnisse beobachtet werden. Bei der Permeation spielt die Stoffverteilung zwischen der Grundlage und der Haut eine sehr wichtige Rolle. Das hydrophile Koffein permeiert mit größter Geschwindigkeit aus der lipophilen Wollwachsalkoholsalbe, wohingegen die lipophilen Testsubstanzen die höchste Permeationsgeschwindigkeit aus dem hydrophilen Carbomergel zeigen. Lediglich für stark lipophile Substanzen wird ein großer Einfluss hydrophiler Hautschichten auf die Permeabilität postuliert, da die Permeation in die lebende Epidermis und in die Dermis in großem Ausmaß von der Löslichkeit der Moleküle in Wasser abhängt [Wilschut et al. 1995].

6.6. Stabilität der Formulierungen

Der erste Schritt bei der Entwicklung halbfester Zubereitungen ist die Untersuchung der intrinsischen Stabilität des Wirkstoffs. Im nächsten Schritt folgt ein Verfahren zur Auffindung einer möglichst stabilen Rezeptur. Hier kommt es darauf an, die Stabilität des Arzneistoffs in Gegenwart von in Frage kommenden Hilfsstoffen abzuklären. Schließlich muss die entwickelte Zubereitung einer abschließenden Stabilitätsprüfung unterzogen werden. Als Stabilität ist dabei die Konstanzhaltung oder die Änderung in einem zulässigen Ausmaß des bei der Herstellung der Formulierung erreichten Zustands, wie z.B. pH-Wert, Viskosität, Keimgehalt, definiert [Voigt 1995]. In der Stabilitätsprüfung werden eventuelle Änderungen des Systems in Abhängigkeit von der Zeit erfasst. Zur Beschleunigung der Stabilitätsprüfung ist die Temperatur ein wichtiger Belastungsparameter. Durch Temperaturänderungen werden im allgemeinen Reaktionsgeschwindigkeit, Dichte, Teilchengröße sowie Viskosität beeinflusst. Die thermische Belastung ermöglicht die Simulation der zu erwartenden Temperaturbelastungen von halbfesten Zubereitungen während ihres Gebrauchszyklus. Unter Normalbedingungen, den so genannten Langzeithaltbarkeitstests, ergeben sich Veränderungen erst nach einer Lagerzeit von mehreren Wochen oder Monaten. Zur Verkürzung der Prüfdauer eignen sich unter anderen so genannte Schaukeltests, bei denen die zu untersuchende Probe in zeitlichem Wechsel mit unterschiedlichen Temperaturen im höheren und tieferen Bereich belastet wird.

Die halbfeste Formulierung muss zudem in chemischer, physikalischer und mikrobiologischer Hinsicht ausreichend stabil sein. Ziel der eigenen Untersuchungen war eine Aussage über die physikalische und chemische Stabilität von Formulierungen anhand eines beschleunigten Haltbarkeitstests treffen zu können. In der Absicht mit Kurzzeittests orientierende Hinweise über das spätere Stabilitätsverhalten der analysierten halbfesten Formulierungen zu ermitteln, wurde eine Stresstabilitätsprüfung über eine Laufzeit von zwei Wochen durchgeführt (Kapitel 10.13). Die Proben wurden täglich jeweils für 12 Stunden einem Temperaturwechsel von -5°C und 40°C unterzogen. Die Eignung dieses Stresstests zur Stabilitätsaussage bei den halbfesten Formulierungen wurde unter anderen durch Rose gezeigt [Rose 1999].

Prüfkriterien

Alle in der ersten Phase verwendeten Formulierungen wurden einem Stresstest unterzogen. Die Stabilitätsmuster wurden makroskopisch und mikroskopisch auf die visuelle Änderungen, wie Aussehen, Homogenität, Ausölen und Phasentrennung geprüft. Die Konsistenzveränderung wurde mit physikalischen Methoden mit Hilfe des Viskosimeters

kontrolliert. Ein weiteres Prüfkriterium bei den Stabilitätsproben war der pH-Wert. Die Änderungen im Wirkstoffgehalt der Formulierungen wurden nach Extraktion mittels Gehaltsbestimmung untersucht. Die quantitativ-galenische Beurteilung der Stabilität erfolgte durch die Kontrolle der Freisetzungsrates aus den Formulierungen. Mikrobiologische Veränderungen wurden in dieser Arbeit nicht verfolgt. Die angewandten Prüfkriterien bei der Stabilitätsuntersuchung sind in Tab. 6.5 dargestellt. Die Prüfpunkte nach zwei Wochen Lagerung unter gestressten Bedingungen wurden mit dem Zeitpunkt Null, also mit den Analyseergebnissen direkt nach Herstellung, verglichen.

Tab. 6.5: Prüfkriterien bei der Stabilitätsuntersuchung

Prüfverfahren	Prüfpunkt	Methode
Makroskopische Beurteilung	Aussehen	visuelle Beurteilung
	Phasentrennung	visuelle Beurteilung
	Ausölen	visuelle Beurteilung
Mikroskopische Beurteilung	Aussehen	Mikroskopie mit Bildauswertung
Chemische Beurteilung	pH-Wert	pH-Messung
Rheologisches Verhalten	Viskosität	Viskosimeter
Quantitative Beurteilung	Wirkstoffgehalt	HPLC-Methode
Quantitativ-galenische Beurteilung	Freisetzung	HPLC-Methode

6.6.1. Visuelle Beurteilung

Makroskopische Beurteilung

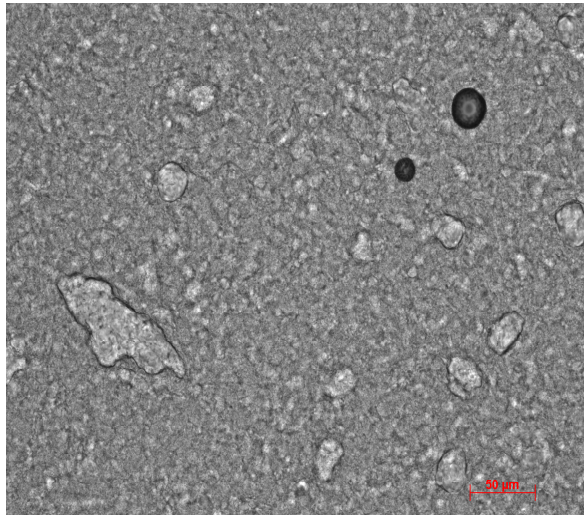
Direkt nach der Herstellung waren alle Basiscremeproben homogen, glänzend und von weißer Farbe. Die Wollwachsalkoholsalbenprüfmuster waren ebenfalls homogen und glänzend. Die Farbe dieser Zubereitung war grünbeige. Für die Basiscreme- und Wollwachsalkoholsalbproben waren keine visuelle Unterschiede für die Formulierungen mit den einzelnen Wirkstoffen bemerkbar. Koffein bildet mit dem Carbomergel ein klares, transparentes Gel. Die im Wasser schwerlöslichen Steroide bilden mit dem Carbomergel ein Suspensionsgel. Das Testosterongel war weniger milchig im Vergleich zu den Gelen mit den Corticosteroiden. Größere Partikelagglomerate wurden im Carbomergel mit dem eingearbeiteten Testosteron beobachtet. Der Wirkstoff hat sich nicht gleichmäßig in der Grundlage verteilt, obwohl angerieben wurde.

Am Ende der Stabilitätsprüfung wurden keine relevanten visuellen Veränderungen in den Prüfmustern festgestellt. Die obere Schicht bei der Basiscreme- und Wollwachsalkoholsalbproben ist fester und mattglänzend geworden. Es wurde keine

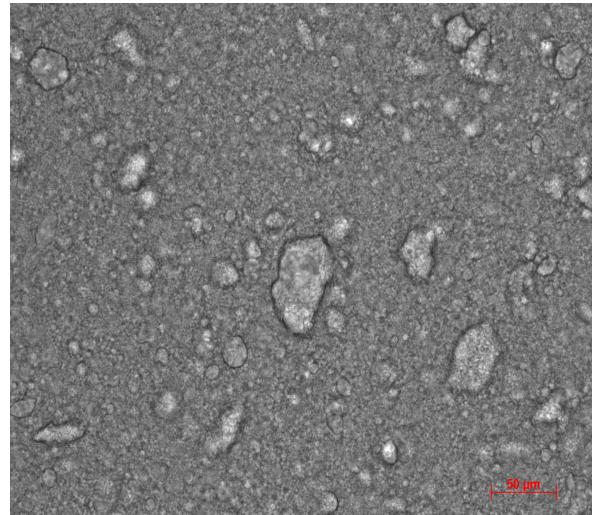
Änderung bezüglich Farbe, Ausölen und Phasentrennung beobachtet. Das Testosterongel war nach der Stabilitätsprüfung etwas klarer und weniger milchig geworden.

Mikroskopische Beurteilung

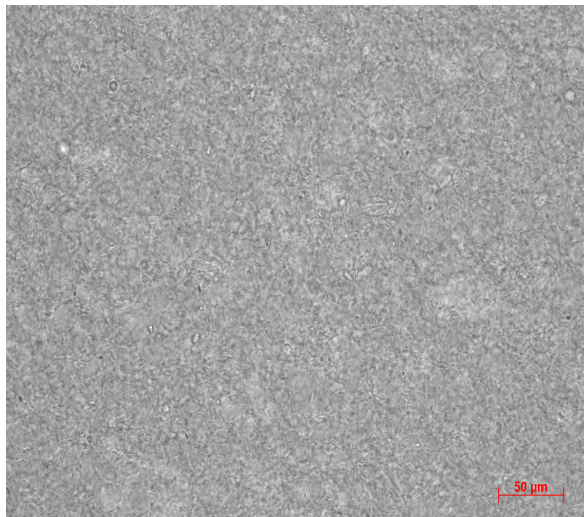
Die mikroskopischen Bilder der Formulierungen und wirkstofffreien Zubereitungen vor der Einlagerung in die Stressprüfung und nach dem Schaukeltest wurden verglichen. Als Beispiel werden hier die Bilder für Hydrocortison-haltige Formulierungen dargestellt.



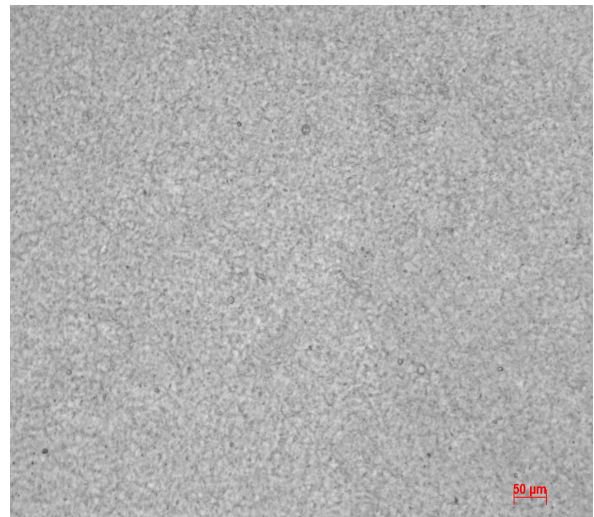
Basiscreme (A)



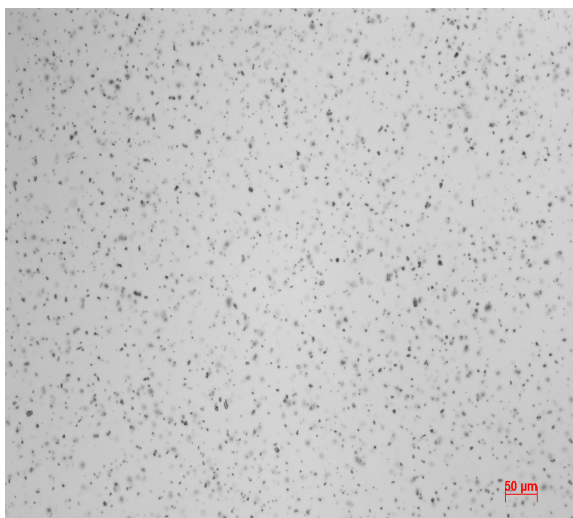
Basiscreme (B)



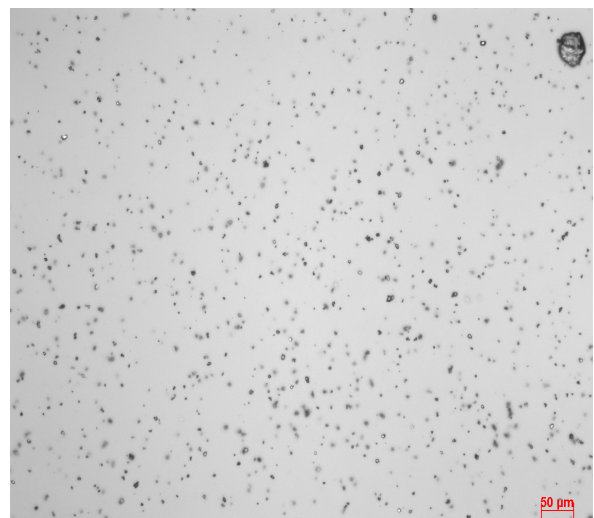
Wollwachsalkoholsalbe (A)



Wollwachsalkoholsalbe (B)



Carbomergel (A)



Carbomergel (B)

Abb. 6.6: Mikroskopische Bilder der Hydrocortison-haltigen Formulierungen vor (A) und nach (B) dem Schaukeltest

Die Struktur der Basiscreme und der Wollwachsalkoholsalbe war sehr gleichmäßig wolkig und diffus, wobei in der Basiscreme strukturierte Bereiche verschiedener Form und Größe zu erkennen waren. Die einzelnen Kristalle waren in den Basiscreme- und Wollwachsalkoholsalbenproben nicht so deutlich erkennbar, wie in den Carbomergelprüfmustern. Koffein lag in dem Carbomergel in gelöstem Zustand vor, was die Abwesenheit von Kristallen in den Koffeingelproben beweist. Im Gegensatz dazu waren die Kristalle in den Gelproben mit den Steroiden gut erkennbar. Im Carbomergel mit Testosteron traten sehr große Agglomerate/Kristallhaufen von 300 bis 500 µm auf, was auch die makroskopische Beurteilung bestätigte. Auch bei dem Hydrocortisongel wurden ungleichmäßige Partikelverteilung und Agglomerate über einen weiten Bereich festgestellt. Bei den anderen Gelproben mit Corticosteroiden wurden einzelne gut ausgebildete Kristalle und wenige kleine Partikelagglomerate (< 50 µm) beobachtet. Die Agglomerate und Kristalle blieben im Verlauf der Lagerung stabil. Es wurde kein Teilchenwachstum in den Prüfmustern festgestellt. Über die geprüfte Lagerzeit war keine mikroskopische Veränderung des Stabilitätszustands erkennbar.

6.6.2. Änderungen im pH-Wert der Zubereitungen

Wie Abbildung 6.7 zeigt, wurden nach der Stabilitätsuntersuchung keine bedeutsamen Änderungen des pH-Wertes für die Basiscreme und für das Carbomergel beobachtet. Für die Wollwachsalkoholsalbe waren keine Messungen möglich.

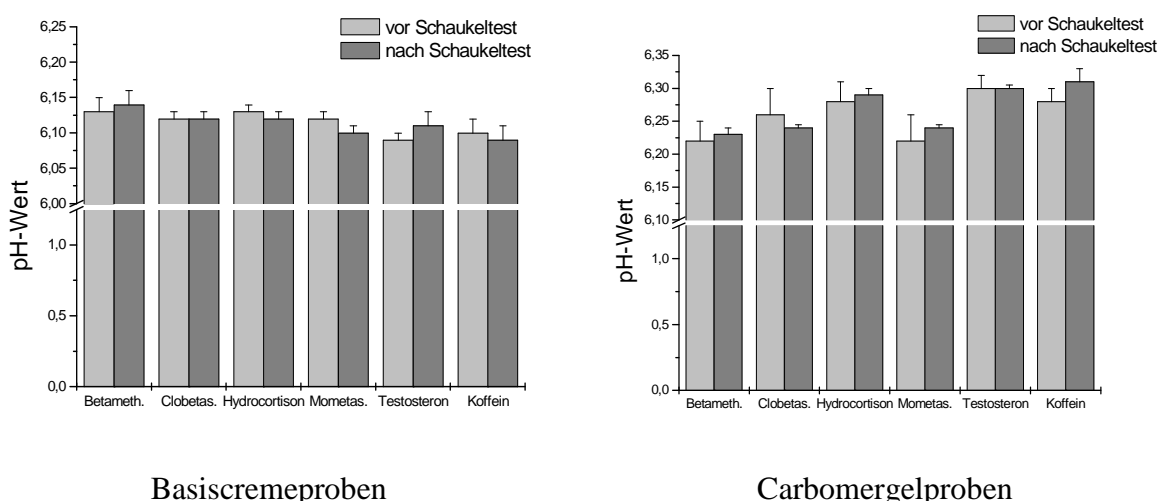


Abb. 6.7: Änderungen im pH-Wert der Zubereitungen

6.6.3. Konsistenzänderung

Viskositätsveränderungen, besonders Viskositätserniedrigungen im Laufe der Lagerzeit, können als erste Symptome einer beginnenden Instabilität angesehen werden. Auf Grund der

hohen Probenmenge wurde eine einfache und schnelle Methode zur Vermessung der Konsistenzveränderung während der Stabilitätsprüfung gesucht. Die Viskositätsprüfung wurde mit einem Viskosimeter bei der Raumtemperatur direkt in den Salbenkruken durchgeführt (Kapitel 10.13.3). Mit dieser einfachen orientierenden Methode können relevante Veränderungen der Konsistenz der Prüfmuster im Verlauf der Lagerung messtechnisch ohne großen Zeitaufwand erfasst werden.

In Abb. 6.8 sind die Ergebnisse der rheologischen Messungen in Schubspannungsskalenteilen dargestellt. Diese repräsentieren einen relativen Wert für bestimmte Schergefälle, die zum Vergleich der Konsistenzveränderungen herangezogen werden können. Das Carbomergel zeigte eine vergleichbare Konsistenz vor und nach der Stabilitätsprüfung. Die Basiscreme- und Wollwachsalkoholsalbenprüfmuster waren nach dem Stresstest viskoser geworden. Ein kleiner Anstieg der Konsistenz nach dem Stresstest wurde für die Basiscremeproben beobachtet. Die Konsistenz war in den meisten Wollwachsalkoholsalbenproben ungefähr um den Faktor von 2 angestiegen.

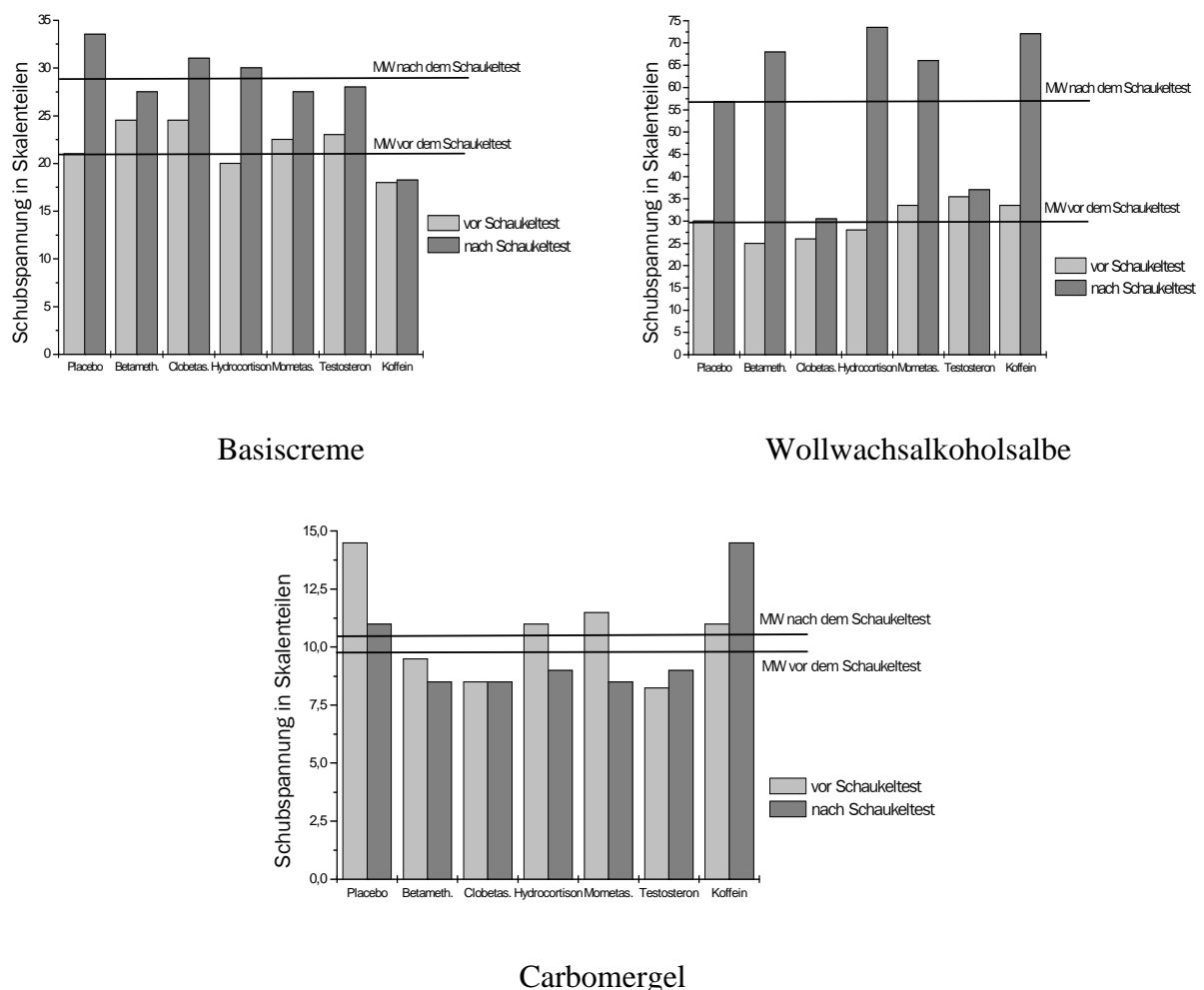
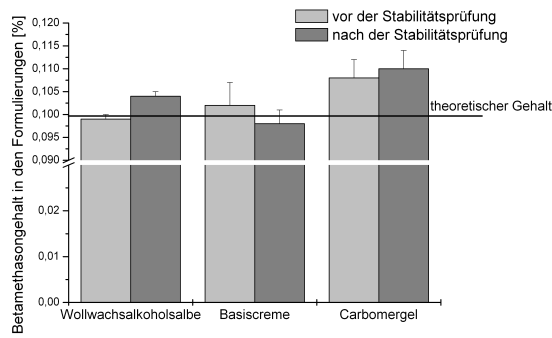


Abb. 6.8: Konsistenzänderungen der Formulierungen

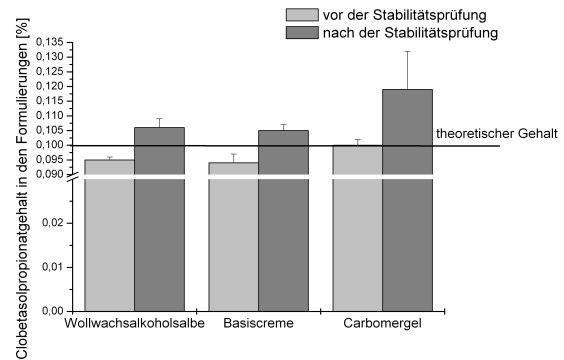
6.6.4. Quantitative Beurteilung

Bereits in der APV-Richtlinie von 1985 [APV 1985] und auch in neueren Richtlinien [ICH 1993] wird darauf hingewiesen, dass ein Arzneimittel so lange haltbar ist, wie noch mindestens 90% des deklarierten Wirkstoffgehaltes vorhanden und dabei keine toxischen Abbauprodukte aufgetreten sind.

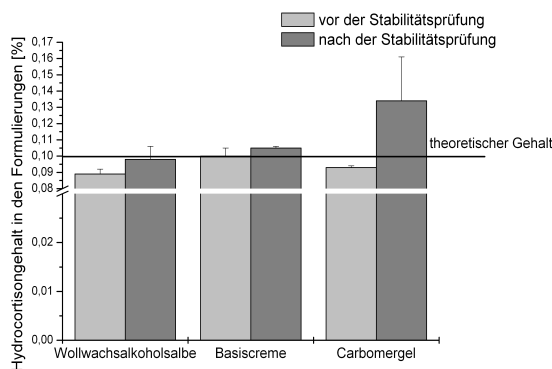
In Abb. 6.9 sind die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung aufgeführt. Die Proben wurden aus dem oberen, mittleren und unteren Bereich der Salbenkruke entnommen, was den Empfehlungen der FDA Guidance for Industry entspricht [FDA 2001]. Der Wirkstoffgehalt hat in diesen Proben leicht variiert, aber es konnte nicht festgestellt werden, dass es zu einer Wirkstoff-Verarmung oder Anreicherung in einem dieser Bereiche der Kruke kam. Besonders in den Gelproben mit Clobetasolpropionat, Hydrocortison, Koffein und Testosteron wurden große Unterschiede bezüglich des Wirkstoffgehalts beobachtet. Der nach der Stabilitätsprüfung höhere Gehalt in diesen Proben ist auf eine Wasserverdunstung zurückzuführen.



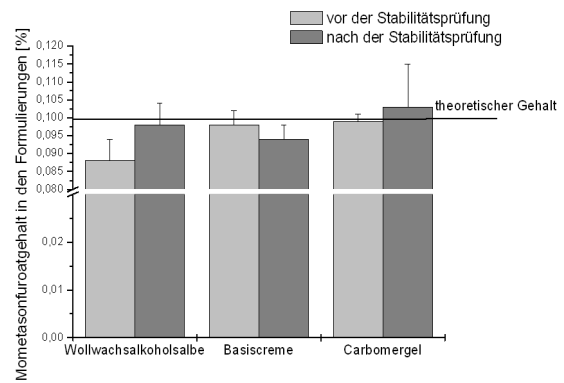
Betamethasonvalerat



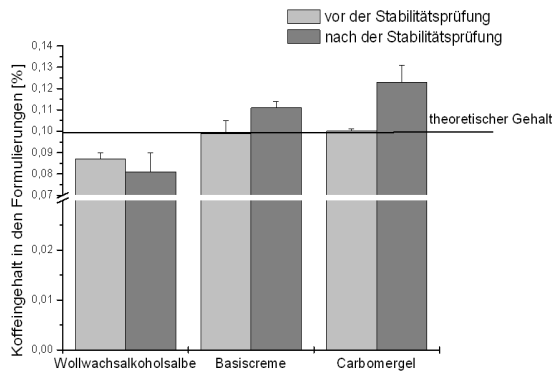
Clobetasolpropionat



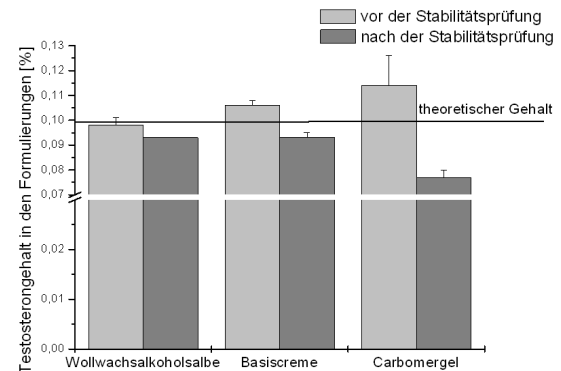
Hydrocortison



Mometasonfuroat



Koffein



Testosteron

Abb. 6.9: Wirkstoffgehalt in den Formulierungen vor und nach der Stabilitätsprüfung, n=3 (MW + SD)

In allen Formulierungen wurden 90% des theoretischen Wirkstoffgehaltes nach der Stresstabilitätsprüfung gefunden. Die einzige Ausnahme bildete das Carbomergel mit Testosteron, wobei dies auf eine ungleichmäßige Wirkstoffverteilung in der Grundlage und nicht auf einen Wirkstoffabbau zurückzuführen ist.

6.6.5. Änderungen in der Freisetzungsrates

Die Durchführung der Freisetzungsversuche aus den Testformulierungen erfolgte nach Empfehlungen der SUPAC-SS Guideline mit Hilfe der Franz-Diffusionszelle, was in Kapitel 10.10 genauer beschrieben wurde. Der Freisetzungsprofil aus den Prüfmustern wurde in dieser Arbeit vor und nach der Stabilitätsprüfung kontrolliert, um die Informationen über die aufgetretenen Instabilitäten in den Formulierungen zu gewinnen, wobei die geänderte Freisetzungsrates nach dem Stabilitätstest nur eine allgemeine Information über eine Änderung des Formulierungszustandes, nicht jedoch über deren Ursache liefern kann. Die während der Lagerung auftretenden physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Veränderungen können eine Änderung des Wirkstofffreisetzungsprofils aus der Formulierung verursachen. Alle Freisetzungsversuche erfolgten in einer Sechsfachbestimmung. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde in Voruntersuchungen nachgewiesen.

Die Auswertung erfolgte nach Empfehlung der SUPAC-SS Guideline, die die in vitro Überprüfung der Produktqualität einer geänderten Testformulierung dem Original gegenüber beschreibt, wobei in dieser Studie als Referenz- und Testprodukt die Ergebnisse der Untersuchungen aus einer Formulierung vor und nach der Einlagerung zu verstehen sind.

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Wirkstofffreisetzungsrates aus den Formulierungen vor und nach der Stabilitätsprüfung sind in Abb. 6.10 dargestellt.

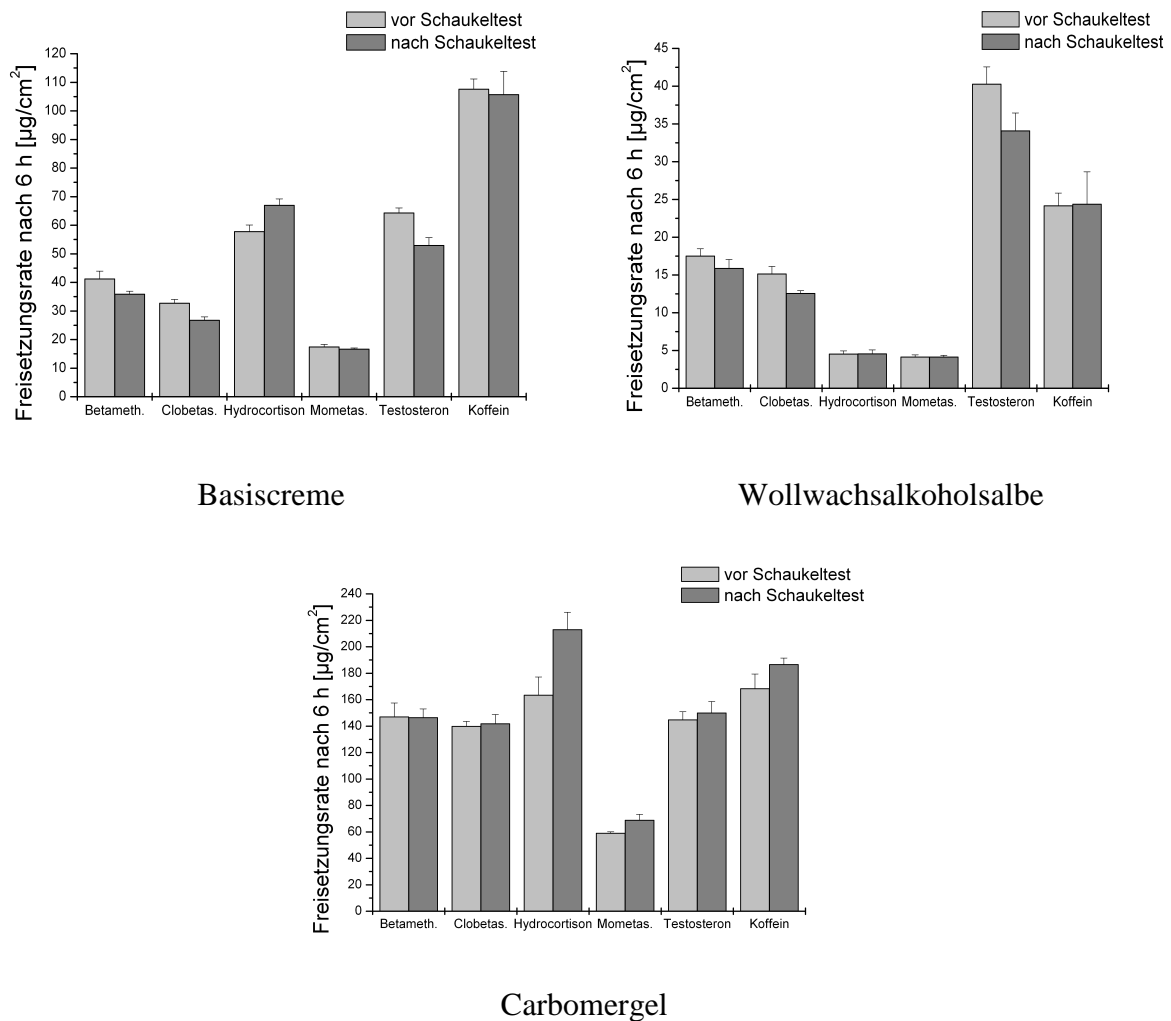


Abb. 6.10: Änderungen der Freisetzungsrates aus den Formulierungen

Die Änderungen der Freisetzungsrates wurden mittels der von SUPAC-SS vorgeschlagenen statistischen Methode verglichen (siehe Kap. 10.13.5). Dabei wird geprüft, ob die ermittelten Quotienten der Kurvensteigungen innerhalb der Unter- und Obergrenze des 90%-Konfidenzintervalls liegen. Der achte Wert (Untergrenze) muss größer als 0,75 und der 29. Wert (Obergrenze) kleiner als 1,3333 sein. Falls die dort vorgegebenen Bedingungen nicht erfüllt werden, wird angenommen, dass in der Formulierung während des Stresstests Änderungen eingetreten sind. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.6 zusammengefasst.

Tab. 6.6: Ergebnisse der Auswertung nach SUPAC-SS (90%-Konfidenzintervall)

Substanz	Formulierung	8. Wert	29. Wert	Grenzen eingehalten
Betamethasonvalerat	Basiscreme	1,060	1,227	ja
	Wollwachsalkoholsalbe	0,978	1,122	ja
	Carbomergel	1,060	1,227	ja
Clobetasolpropionat	Basiscreme	1,170	1,280	ja
	Wollwachsalkoholsalbe	1,051	1,195	ja
	Carbomergel	0,941	1,102	ja
Hydrocortison	Basiscreme	0,900	0,964	ja
	Wollwachsalkoholsalbe	0,892	1,122	ja
	Carbomergel	0,921	1,303	ja
Mometasonfuroat	Basiscreme	0,997	1,075	ja
	Wollwachsalkoholsalbe	0,950	1,115	ja
	Carbomergel	0,790	0,871	ja
Testosteron	Basiscreme	1,158	1,330	ja
	Wollwachsalkoholsalbe	1,083	1,292	ja
	Carbomergel	0,709	0,910	nein
Koffein	Basiscreme	0,969	1,112	ja
	Wollwachsalkoholsalbe	0,930	1,218	ja
	Carbomergel	0,850	1,288	ja

Bis auf das Carbomergel mit Testosteron lagen die Werte für alle Formulierungen innerhalb des 90%-Konfidenzintervalls. Für das Carbomergel mit Testosteron wurde die Untergrenze des Konfidenzintervalls unterschritten. Der Grund liegt wahrscheinlich in einer nicht gleichmäßigen Testosteronverteilung in dieser Grundlage, was durch makroskopische und mikroskopische Beobachtungen bestätigt wurde.

6.7. Zusammenfassung und Diskussion

Wirkstofffreisetzung aus den Zubereitungen

Die Grundlagen zeigten Unterschiede in der Wirkstoffliberation. Das beobachtete Freisetzungsrang war für alle Wirkstoffe übereinstimmend: Carbomergel > Basiscreme > Wollwachsalkoholsalbe. Die Gel-Formulierungen zeigten gegenüber den Basiscreme- und Wollwachsalkoholsalbezubereitungen eine deutlich höhere Freisetzungsrate. Die Viskosität der hydrophilen Grundlage war geringer als die der lipophilen und amphiphilen wodurch eine Wirkstoffdiffusion innerhalb der Formulierung begünstigt wurde. Entsprechend der

ansteigenden Viskosität wurde die langsamste Wirkstoffliberation bei der dickflüssigen Wollwachsalkoholsalbe beobachtet. Die Viskosität der Grundlage ist aber nur eine physikalische Eigenschaft und spiegelt nicht in allen Fällen die Wirkstoffsfreisetzungsrate aus den Formulierungen wider. Hierbei werden nicht alle Interaktionen zwischen dem aktiven Wirkstoff und den Hilfsstoffen berücksichtigt. Gallagher et al. haben zwei unterschiedliche Gele mit vergleichbaren rheologischen Eigenschaften in Bezug auf die Wirkstofffreisetzung untersucht. Ihre Untersuchungen haben gezeigt, dass trotz der großen Ähnlichkeit der Rheologie der Gele die Freisetzungsrate aus einem der beiden analysierten Gele fast doppelt so hoch war [Gallagher et al. 2003].

Auf Grund der hydrophilen Eigenschaften der angesetzten Membran konnte in den eigenen Untersuchungen bei dem Carbomergeleinsatz eine Diffusion des Akzeptormediums durch die Membran und eine daraus resultierende Interaktionen mit den Zubereitungen nicht ausgeschlossen werden.

Permeationsuntersuchungen

Die Faktoren, die einen großen Einfluss auf die Freisetzung des Wirkstoffs aus der Grundlage haben, wie z.B. die Viskosität der Zubereitung, scheinen bei der Hautpermeation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, was durch die Transportstudien bestätigt wurde. Die Ergebnisse aus den in vitro Permeationsuntersuchungen zeigen deutlich, dass der Transport von Testsubstanzen über die Haut formulierungsspezifisch ist. In Abhängigkeit vom angewandten Formulierungstyp wurden unterschiedliche Wirkstoffpermeationsraten nachgewiesen, wobei für die Steroide, Testosteron, Hydrocortison und Betamethasonvalerat, die höchste Permeationsrate aus dem hydrophilen Carbomergel festgestellt wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Wagner, die eine Transportsteigerung eines lipophilen Arzneistoffs, Flufenaminsäure, nach der Applikation hydrophiler Grundlage im Vergleich zu einer lipophilen Grundlage beobachtete [Wagner 2001]. Im Gegensatz zu lipophilen Testsubstanzen lieferte für das hydrophile Koffein die lipophile Wollwachsalkoholsalbe die größte transdermale Wirkstoffmenge. Eine Erklärung für den erhöhten Koffeintransport aus der Salbe ist, dass vermutlich die in das Stratum corneum abgegebenen flüssigen Bestandteile der lipophilen Grundlage die Absorption der hydrophilen Substanz fördern. Anhand der Freisetzungsversuche durch eine Dialysemembran sowie der bestimmten Viskosität bzw. Konsistenz wäre jedoch ein anderes Ergebnis für die in vitro Permeation zu erwarten gewesen. Die Bestandteile der Wollwachsalkoholsalbe müssen für Koffein hinsichtlich des Transports durch Humanhaut Eigenschaften besitzen, die sich nicht mit einfachen physikalischen Messmethoden erfassen lassen. Die amphiphile

Basiscreme zeigte für fast alle Testsubstanzen die niedrigste Permeation. Vermutlich bildete sich nach Applikation der Zubereitungen mit den Corticosteroiden ein Wirkstoffdepot im Stratum corneum mit zeitlich konstantem Gehalt, aus dem nur geringe Mengen in die tieferen Hautschichten bzw. hier bis ins Akzeptormedium diffundierten [Krause 2001]. Solch ein Wirkstoffdepot in der Hornschicht war besonders deutlich im Falle der drei Corticosteroiden der neuesten Generation Betamethasonvalerat, Clobetasolpropionat und Mometasonfuroat ausgeprägt, wo nach 24-stündiger Inkubation keine oder nur minimale Arzneistoffmengen im Akzeptor detektiert wurden. Dies gilt für alle drei Grundlagentypen. Der Vergleich der Permeationsdaten mit den zuvor diskutierten Werten aus der Literatur zeigt, dass die ermittelten Permeabilitäten in der gleichen Größenordnung liegen. Die Ergebnisse der in vitro Permeationsuntersuchungen zeigen, dass sich die Permeabilität der Haut für einen Wirkstoff in Abhängigkeit von der Grundlage, in der er appliziert wird, ändert. Eine analoge Testreihe wurde von Lieken mit Wasser und Paraffin als Vehikel durchgeführt und führte zu dem Ergebnis, dass bei Verwendung von einem lipophilen Vehikel die Haut für die hydrophilen Modellschubstanzen eine höhere Permeabilität als für die lipophilen aufweist und umgekehrt im Falle eines wässrigen Vehikels [Lieken 2003]. Dies korreliert gut mit den eigenen Beobachtungen. Generell zeigte sich die Tendenz, dass Substanzen aus Vehikeln in denen sie schlecht löslich sind, höhere Permeabilitäten aufweisen, da hier ein günstigerer Verteilungskoeffizient zwischen der Hornschicht und dem Vehikel vorliegt, was mit den Ergebnissen von Lieken, Wagner und Csoka et al. übereinstimmt [Lieken 2003, Csoka et al. 2005, Wagner 2001]. Kleinere Verteilungskoeffizienten zwischen Stratum corneum und Vehikel führen entsprechend Gleichung 2.3 zu einer geringeren Hautpermeabilität. Die Steroide zeigten somit wegen ihrer hohen Affinität zu lipophilen Vehikeln einen kleinen Verteilungskoeffizienten zwischen Stratum corneum und Wollwachsalkoholsalbe, was in einer niedrigeren Permeabilität resultiert. Das hydrophile Koffein, das sich nur geringfügig im lipophilen Vehikel löst, zeigt dagegen auf Grund des höheren Verteilungskoeffizienten zwischen der Hornschicht und Wollwachsalkoholsalbe eine höhere Permeabilität im Vergleich mit dem hydrophilen Gel und der amphiphilen Creme. Laut Lieken kann aber die hohe Permeabilität der Haut für hydrophile und die niedrige Permeabilität für lipophile Wirkstoffe bei Verwendung lipophiler Vehikel nicht nur mit der Verteilung der Substanz aus dem lipophilen Vehikel in das relativ hydrophilere Stratum corneum erklärt werden [Lieken 2003]. Eine wichtige Rolle spielt dabei, dass die stärker hydratisierten Hautschichten bei Einsatz lipophiler Vehikel die geschwindigkeitsbestimmende Barriere für die lipophilen Testsubstanzen bildet.

Die Hautresorption kann für Kontrollzwecke in der präklinischen Entwicklungsphase *in vitro* an menschlicher Haut und an Tierhaut untersucht werden [OECD 2004]. Gemäß der Richtlinie 428 ergänzenden Technischen Leitlinie 428 kann prinzipiell auch rekonstruierte menschliche Epidermis dazu verwendet werden [OECD 2004b]. Die hier getestete rekonstruierte menschliche Epidermis war deutlich permeabler als Humanhaut, was mit Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt [Asbill et al. 2000, Schmook et al. 2001, Dreher et al. 2002, Schäfer-Korting et al. 2006, Schäfer-Korting et al. eingereicht, Netzlaff et al. 2006 a, Gysler et al. 1999 a, Lieken 2003]. Das relative Ranking über Episkin[®] spiegelt jedoch die Permeation in der humanen Epidermis wider. Prinzipiell erscheint somit der Einsatz von rekonstruierter menschlicher Epidermis für die Vorhersage der Wirkstoffpermeabilität möglich. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis der in letzter Zeit durchgeführten Validerungsstudie zur Qualifizierung rekonstruierter menschlicher Epidermis für *in vitro* Resorptionsstudien [Schäfer-Korting et al. eingereicht]. Das relative Permeationsverhalten einer Testsubstanz, die in verschiedene Vehikel eingearbeitet wurde, lässt sich somit prinzipiell anhand von Untersuchungen mit rekonstruierter Epidermis erfassen. Resümierend erscheint der Einsatz rekonstruierter menschlicher Epidermis in der Entwicklungsphase von halbfesten Formulierungen sehr sinnvoll. Als großer Vorteil wird hierbei vor allem gesehen: die problemlose Verfügbarkeit und die kürzere Zeit, die notwendig ist, um die Daten zu erfassen. Die rekonstruierten Humanhautmodelle könnten zur Identifizierung der Substanzen mit potentiellen Transportschwierigkeiten sowie bei der Auswahl der geeigneten Grundlage in der Entwicklungsphase unterstützen.

Die experimentell bestimmten Permeationskoeffizienten korrelieren nicht mit den auf der Grundlage zweier theoretischer QSPR-Modelle errechneten P_{app} -Erwartungswerten. Zum ähnlichen Ergebnis ist ebenfalls die Arbeitsgruppe von Schäfer-Korting gekommen, welche die gleichen *in silico* Modelle in Betracht gezogen hat [Schäfer-Korting et al. eingereicht]. Substanzen mit hoher Lipophilie werden dabei überschätzt und das hydrophile Koffein wird unterschätzt. Bei sehr lipophilen Wirkstoffen, zu denen Betamethasonvalerat, Clobetasolpropionat und Mometasonfuroat gehören, wird auf Grund deren geringeren Wasserlöslichkeit die Verteilung in hydrophile Bereiche wie z.B. lebende Epidermis geschwindigkeitsbestimmend. Dagegen erfolgt die Permeation des Koffeins, einem hydrophilen Wirkstoff geringen Molekularvolumens, durch hydrophile bzw. wassergefüllte Regionen der Haut. Für das eingesetzte Substanzpanel sind die QSPR-Modelle somit nicht einsetzbar. Dazu trägt wesentlich bei, dass die Corticosteroide zu den Ausreißern bei solchen Modellen gehören [Moss et al. 2002]. Aber auch die experimentellen und berechneten P_{app} -

Werte von Koffein und Testosteron korrelierten nicht. Eine Erklärung dafür könnte auch sein, dass diese *in silico* Modelle im Grunde zur Vorhersage der P_{app} -Werte aus wässrigen Lösungen dienen und somit nicht den Vehikeinfluss auf den Wirkstofftransport berücksichtigen. Ein weiterer Grund für die geringe Korrelation ist die Tatsache, dass die *in silico* Modelle auf der Basis von experimentellen Daten erstellt wurden, die aus sehr unterschiedlichen Versuchsreihen stammen. Obwohl für hier untersuchten Modellsubstanzen die anhand von *in silico* Modellen gewonnen P_{app} -Werte nicht mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmen, scheint es sinnvoll, für neue Wirkstoffkandidaten eine erste Abschätzung ihrer Permeabilität anhand von QSPR-Modellen durchzuführen. Man geht davon aus, dass sich die Vorhersage der Wirkstoffabsorption mit *in silico* Modellen in Zukunft verbessert.

Formulierungsstabilität

Die Formulierungsstabilität wurde nach einer zweiwöchigen Lagerung der Proben bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ im periodischen Wechsel untersucht. In Kapitel 4 wurde darauf hingewiesen, dass detaillierte Einblicke in den Aufbau der Zubereitungen hinsichtlich elastischer und viskoser Anteile mit Hilfe von oszillationsrheologischen Untersuchungsmethoden erfasst werden können. Nachteilig an diesen Messungen war aber der große Zeitaufwand bei großer Probenanzahl. Daher wurden zur Charakterisierung der Veränderungen in den Proben vor und nach Einlagerung beim beschleunigten Stabilitätstest einfachere und schnellere Methoden bevorzugt (Viskositätsprüfung mittels eines Viskosimeters), die die Messung direkt in den Salbenbehältern ermöglichten. Die makroskopische und mikroskopische Analyse lässt auf eine homogene Phasenverteilung schließen. Eine inhomogene Testosteronverteilung wurde im Carbomergel beobachtet, was wahrscheinlich durch die Einarbeitung des nicht mikronisierten Wirkstoffs in die Grundlage verursacht wurde. Es ist keine bedeutsame pH-Wertänderung über die geprüfte Laufzeit bei den Carbomergel- und Basiscremeprüfmustern aufgetreten. Der pH-Wert der Basiscreme- und Carbomergel-Formulierungen variierte zwischen 6 und 6,5, was die gewünschte Bedingung für die Stabilität der Wirkstoffe erfüllt (siehe Kapitel 4.2.6). Kleine Änderungen der Formulierungskonsistenz wurden nach dem beschleunigten Haltbarkeitstest mit dem Viskosimeter erfasst. Es ist bekannt, dass die halbfesten Formulierungen während der Aufbewahrung einer Nachhärtung unterliegen können, was zu einer Einbuße der Applikationsfähigkeit führt [Voigt 1995]. Die Konsistenzveränderungen für Basiscremeproben und Wollwachsalkoholsalbeprüfmuster wurden ebenfalls durch die visuelle Beurteilung bestätigt. Die obere Schicht in der Salbenkruke ist während der Stabilitätsuntersuchung fester geworden. Diese Veränderung des Konsistenzzustands hatte

jedoch keinen bedeutsamen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzungsrates aus den Formulierungen. Bei den Carbomergelproben mit den Steroiden wurde teilweise eine inhomogene Verteilung von unterschiedlich großen Kristallen und Agglomeraten mikroskopisch und makroskopisch beobachtet. Diese inhomogene Substanzverteilung ist wahrscheinlich die Ursache für die schwankenden Gehaltswerte in den Gelproben. Das Aufkonzentrieren der Gelproben (durch Wasserverdunstung) kann den manchmal oberhalb des theoretischen Wertes liegenden Gehaltswert erklären. Die allgemeine Vorhersage über die Stabilität der Formulierungen wurde durch Untersuchung der Wirkstofffreisetzungsprofile aus den Formulierungen getroffen. Das nur geringfügig geänderte Profil zeigt, dass die geforderte physikalische und chemische Stabilität bei den Formulierungen über die geprüfte Laufzeit erfüllt wird. Im Allgemeinen sind das Aussehen, die physikalischen und chemischen Eigenschaften der untersuchten Formulierungen unter den getesteten Lagerbedingungen stabil. Der durchgeführte kurzzeitige Stabilitätstest deutet nicht auf eine bedeutsame Veränderung der Stabilitätszustands der untersuchten Formulierungen hin. Eine exakte Aussage und Vorhersage über die Langzeitstabilität ist jedoch nur mit Einschränkungen möglich.

Schlussfolgerung

Im Hinblick auf die Ziele in der präklinischen Entwicklungsphase ist es offensichtlich, dass eine Formulierung eine ausreichende Wirkstoffabgabe gewährleisten muss. Die Experimente ergaben jedoch, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit deutlich höher als die perkutane Absorptionsgeschwindigkeit ist. Somit erscheint die Untersuchung zur reinen Liberation eines Wirkstoff aus der Formulierung nicht obligatorisch in der frühen präklinischen Entwicklungsphase einer halbfesten Formulierung. Daraus resultiert, dass auch die Bestimmung der rheologischen Eigenschaften der Grundlagen, die primär die Freisetzungsgeschwindigkeit beeinflussen auch zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen kann. Darüber hinaus muss die halbfeste Formulierung eine ausreichende Stabilität des inkorporierten Wirkstoffs gewährleisten und selbst stabil bleiben. Mittels beschleunigter Stresstabilitätsprüfung können erste Aussagen über die Formulationsstabilität getroffen werden. Hier erscheint die Betrachtung der Änderungen in der Freisetzungsrates als Untersuchung der komplexen Änderungen in der Formulierung nach dem Stresstest sinnvoll. Zurückgreifend auf die im Rahmen des dritten Kapitels bestimmten physikochemischen Eigenschaften der Modellsubstanzen in Verbindung mit ihrem beobachteten Transport über die Haut lässt sich sagen, dass besonders die Löslichkeit, die Molmasse und die Verteilungskoeffizienten des Wirkstoffs zu den transportsbeeinflussenden Parametern

gehören. Es bestehen jedoch keine einfache Korrelationen zwischen diesen Wirkstoffeigenschaften und dem Massentransport der untersuchten Substanzen, was auch durch die unzureichende Vorhersage der Permeationsgeschwindigkeit anhand der *in silico* Modellen bestätigt werden konnte. Der einzige Parameter, der direkt mit dem P_{app} -Wert korreliert, ist die Molmasse der Modellsubstanzen, was in Abb. 6.11 für Koffein, Hydrocortison und Testosteron dargestellt ist. Die weiteren drei Modellsubstanzen konnten auf Grund des geringeren bzw. negativen Transports über die Haut in dieser Korrelation nicht berücksichtigt werden.

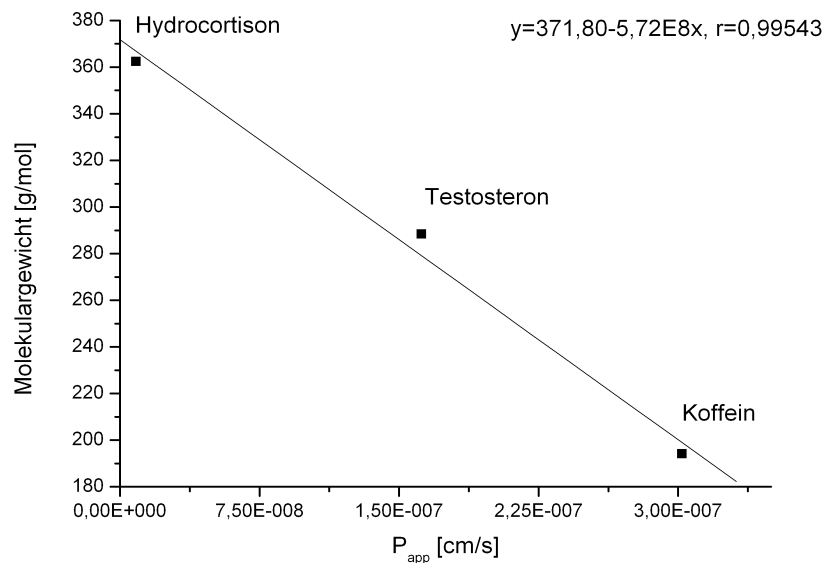


Abb. 6.11: Abhängigkeit der Permeationsgeschwindigkeit von der Molmasse der drei Testsubstanzen Hydrocortison, Testosteron und Koffein

Allerdings hat selbst diese Korrelation wenig Aussagekraft, da nicht alle Modellsubstanzen zur Evaluierung herangezogen werden konnten. Zur Zeit ist somit eine exakte Vorhersage der Permeabilität einer Substanz anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht möglich. Um so wichtiger erscheinen jedoch experimentelle Untersuchungen zur *in vitro* Absorption.

7. Optimierung der halbfesten Zubereitungen

Während der Entwicklung einer halbfesten Zubereitung kommt es häufig dazu, dass der eingesetzte Wirkstoff zu wenig hautpermeabel ist und er somit den gewünschten Wirkungsort nicht oder in nicht ausreichender Menge erreicht, um einen therapeutischen Effekt auszuüben. Hier sind weitere Strategien notwendig, die die Wirkstoffaufnahme in die Haut fördern. Aus galenischer Sicht kann die angestrebte Transportbeschleunigung durch eine Übersättigung der Grundlage, Auswahl einer anderen Grundlage, die z.B. den Hydratationsgrad der Haut erhöht oder durch Zugabe chemischer Penetrationsbeschleuniger zum Vehikel erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Strategie zur Verbesserung der Hautpermeation durch Einarbeitung von Penetrationsbeschleunigern angestrebt.

Die Kompatibilität der aktiven Substanz mit den ausgewählten Penetrationsbeschleunigern muss hierbei als erstes untersucht werden. Die Wirkstofflöslichkeit im Vehikel und die Viskosität der Grundlage bilden zwei weitere wichtige Faktoren, die bei der Interpretation der Permeationsergebnisse unter Anwendung der modifizierten Zubereitungen berücksichtigt werden. Die Löslichkeit der aktiven Substanz in der Grundlage beeinflusst sowohl die thermodynamische Aktivität als auch die Verteilung des Wirkstoffs zwischen Vehikel und Haut. Die ermittelte Sättigungslöslichkeit erleichtert eine Interpretation der Permeationsuntersuchungen und eine Beurteilung der Wirkung der ausgesuchten Transportbeschleuniger, da nur der in der Zubereitung gelöste Wirkstoffanteil diffundieren kann [Wagner 2001]. Die Viskosität der Zubereitung kann eine wichtige Rolle bei der Wirkstofffreisetzung aus der Grundlage spielen. Die rheologische Charakterisierung der modifizierten Grundlagen erfolgte durch Messen der plastischen Viskosität.

Um die Wirkung der Absorptionsbeschleuniger besser verstehen zu können, wurden drei Penetrationsverbesserer aus unterschiedlichen chemischen Gruppen ausgesucht: Aus der Gruppe der Fettsäureester das Isopropylmyristat (IPM), aus den nichtionischen Tensiden der Zuckerester Saccharosestearat (SS) und als mehrwertiger Alkohol das Propylenglycol (PG). Weiterhin hängt die Wirkung eines Permeationsbeschleunigers nicht nur von seiner chemischen Struktur, sondern auch von seiner Konzentration im Vehikel ab. Deshalb ist es von großer Bedeutung, die Konzentration der optimalen Wirkung zu bestimmen. Von großem Interesse sind auch Mischungen von Permeationsenhancern. Es wird dabei geprüft, ob sich ihre Aktivität durch Kombination mit einem weiteren Beschleuniger steigern lässt. Deshalb wurde in der „Arbeitsphase II“ der Einfluss von drei unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Permeationsbeschleunigers und von drei unterschiedlich konzentrierten Isopropylmyristat-Propylenglycol-Mischungen auf den transdermalen Transport von drei

Modellsubstanzen untersucht. Insgesamt dreizehn Grundlagen, die in Tab. 7.1 aufgelistet sind, wurden in ihrer Effizienz bezüglich der Permeation von Hydrocortison, Testosteron und Koffein über hitzeseparierte Epidermis verglichen. Weitere Möglichkeiten zur Beeinflussung der Wirkstoffpenetration, wie physikalische Methoden (zum Beispiel Iontophorese, Elektrophorese, Laserbehandlung, Behandlung mit Mikronadeln) werden hier nicht beschrieben. Eine gute Bewertung und Beschreibung der Möglichkeiten zur Transportoptimierung eines Wirkstoffs wurde in der Literatur dargestellt [Daniels 2004, Barry 2001, Foldvari 2000, Walker und Smith 1996].

Tab. 7.1: Zusammensetzung der modifizierten Grundlagen aus der Phase II, HPMC= Hydroxypropylmethylcellulose

Grundlage Nr.	Zusammensetzung [%; m/m]						
	NaOH 5% (m/V)	Carbomer	HPMC	Wasser	IPM	PG	SS
G1 (Kontrolle)	3	0,5	2	94,5	0	0	0
G2	3	0,5	2	89,5	5	0	0
G3	3	0,5	2	84,5	10	0	0
G4	3	0,5	2	74,5	20	0	0
G5	3	0,5	2	89,5	0	5	0
G6	3	0,5	2	84,5	0	10	0
G7	3	0,5	2	74,5	0	20	0
G8	3	0,5	2	93,5	0	0	1
G9	3	0,5	2	92,0	0	0	2,5
G10	3	0,5	2	89,5	0	0	5
G11	3	0,5	2	84,5	5	5	0
G12	3	0,5	2	74,5	5	15	0
G13	3	0,5	2	74,5	15	5	0

7.1. Permeationsbeschleunigerauswahl

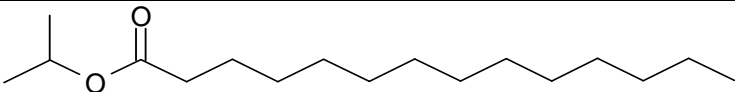
Die Abhängigkeit zwischen der Struktur eines Penetrationsbeschleunigers und dem Wirkstoff ist noch nicht vollständig geklärt. Einige Penetrationsbeschleuniger erhöhen nur für bestimmte Wirkstoffe die Transportrate, während für andere Substanzen dieser Effekt nicht beobachtet wird. Die Effizienz eines Permeationsbeschleunigers hängt somit nicht nur von seiner chemischen Struktur, sondern auch von den physikochemischen Eigenschaften der aktiven Substanz sowie von den Vehikeleigenschaften und der Vehikelzusammensetzung ab [Cazares-Delgadillo et al. 2005, Ayala-Bravo et al. 2003, Brinkmann 2006]. Verschiedene chemische Substanzen haben mittlerweile eine Anwendung als Penetrationsbeschleuniger gefunden [Kogan und Garti 2006]. Im Folgenden sollen von den permeationsfördernden

Substanzen diejenigen beschrieben werden, die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt wurden, um auf dieser Basis mögliche Mechanismen zu diskutieren.

7.1.1. Isopropylmyristat

Das Isopropylmyristat (IPM) findet pharmazeutische Anwendung als Spreitungsmittel und Penetrationsförderer in halbfesten Zubereitungen [Richter 2004, Müller-Goymann und Refai 2000, Krause 2001]. Dieser Fettsäureester ist bei Raumtemperatur eine klare, farblose, ölige Flüssigkeit, die mit Mineral- und Pflanzenölen mischbar ist. Der Isopropylester der Myristinsäure mischt sich jedoch nicht mit Wasser, Propylenglycol und Glycerol. Die Substanz weist zusätzlich eine gute dermale Verträglichkeit auf. Ihre penetrationssteigernden Effekte für verschiedene Wirkstoffe, z.B. Salbutamolsulfat oder Benzotripin, wurden in der Literatur mehrfach beschrieben [Leichtnam et al. 2006, Budhathoki und Thapa 2005, Gorukanti et al. 1999]. Isopropylmyristat als ein Penetrationsverbesserer geht eine Wechselwirkung mit der Lipidmatrix der Hornschicht ein [Gorukanti et al. 1999], was in einer Abnahme der Barriere-Eigenschaft des Stratum corneum resultiert.

Tab. 7.2: Physikochemische Angaben zum Isopropylmyristat

Chemische Struktur	
Strukturformel	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$
CAS-Nummer	110-27-0
Molmasse [g/mol]	270,45
Dichte [g/mL]	0,853
Viskosität [mPa·s]	5-6

7.1.2. Propylenglycol

Propylenglycol (PG) wird häufig als Lösungsvermittler in der Dermatologie genutzt [Voigt 1995, Richter 2004]. Propylenglycol ist bei Raumtemperatur eine klare, farblose Flüssigkeit. Die Substanz ist mit Wasser, Ethanol und vielen ätherischen Ölen mischbar und weist zusätzlich eine antimikrobielle Wirksamkeit auf. Hinsichtlich seiner Eigenschaften als Penetrationsförderer wird Propylenglycol in der Literatur unterschiedlich bewertet [Krause 2001, Voigt 1995, Oh et al. 2001, Liu et al. 2006, Heard et al. 2006, Levang et al. 1999, Barry 1987, Rosado und Rodrigues 2003, Foldvari 2000]. Rosado und Rodrigues konnten einen transportfördernden Effekt durch Propylenglycol für Methylen blue und Sudan III feststellen [Rosado und Rodrigues 2003]. Im Gegensatz dazu wurde für Koffein und Aspirin eine Verschlechterung des Transportes beschrieben [Heard et al. 2006, Levang et al. 1999]. Keine

Verbesserung wurde ebenfalls für Melatonin und Cyclosporin A beobachtet [Oh et al. 2001, Liu et al. 2006].

Von Vorteil ist, dass die Anwendung von Propylenglycol keine signifikante Veränderung in der Morphologie von Langerhans Zellen verursacht, wozu zum Beispiel die Anwendung von Ölsäure führen kann [Touitou et al. 2002].

Tab. 7.3: Physikochemische Angaben zum Propylenglycol

Chemische Struktur	
Strukturformel	$C_3H_8O_2$
CAS-Nummer	57-55-6
Molmasse [g/mol]	76,09
Dichte [g/mL]	1,0380
Viskosität [mPa·s]	56

7.1.3. Saccharosestearat

Saccharoseester gehören zu den besonders hautverträglichen nichtionischen Tensiden [Csoka et al. 2006]. Sie entstehen durch die Veresterung des Zuckers mit Fettsäuren. Die Zuckerester besitzen somit Zucker als polaren Kopf und eine lange Kohlenwasserstoffkette als lipophile Gruppe [Tadros 2005]. Zur Zeit werden sie hauptsächlich als Zusatzstoffe in der Lebensmittelindustrie verwendet. In jüngerer Zeit werden Zuckerester zunehmend auch in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt [Patent 20050238677, Ayala-Bravo et al. 2003, Vermeire et al. 1996, Okamoto et al. 2005]. Sie weisen eine sehr niedrigere Haut- und Augenreizung auf [Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation 2003]. Zuckerester sind biologisch abbaubar, nichttoxisch, geruchlos und können einen sehr großen Bereich von HLB-Werten abdecken. Auf Grund ihrer großen Bandbreite an HLB-Werten sind sie in der Lage, sowohl O/W als auch W/O Systeme zu stabilisieren. Zusätzlich sind Saccharoseester durch eine antibakterielle Wirkung charakterisiert. Insgesamt lässt sich eine hervorragende Eignung dieser Substanzen zur topischen Anwendung ableiten.

Dennoch können Zuckerester die Bariereigenschaften der Haut reversibel beeinflussen und dadurch auch den transdermalen Transport von einigen Wirkstoffen beschleunigen [Ayala-Bravo et al. 2003, Okamoto et al. 2005]. Obwohl Saccharoseester den Hydratationsgrad der Haut erhöhen können, was wiederum die Permeabilität erhöht, wird als Hauptmechanismus bei der Transportbeschleunigung ihre Wirkung auf die Stratum corneum Lipide angesehen [Vermeire et al. 1996]. Zur Zeit gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit dieser

Thematik beschäftigen. Ihre Anwendung als Transportverbesserer ist somit nicht ausreichend in der Literatur dokumentiert.

Ayala-Bravo et al. haben demonstriert, dass Saccharoselaureat und Saccharoseoleat auf die Stratum corneum-Lipide durch eine Erhöhung der Fluidisierung und durch Extraktion der interzellulären Lipide wirken [Ayala-Bravo et al. 2003]. Dies ermöglicht eine leichtere Wirkstoffpassage durch die Haut. Vermeire et al. haben weiterhin nachgewiesen, dass Saccharoselaurat die perkutante Absorption von Östradiol beim Kaninchen erhöht [Vermeire et al. 1996]. Okamoto et al., die den Zuckerestereinfluss in Abhängigkeit von unterschiedlichen HLB-Werten auf die Permeation von Lidocain und Ketoprofen untersucht haben, konnten zeigen, dass einige Zuckerester insbesondere in Vehikeln, die Propylenglycol enthalten, besonders gut als Penetrationsbeschleuniger geeignet sind [Okamoto et al. 2005]. Die Aktivität der Zuckerester zur Permeationsbeschleunigung wird meistens mit einem HLB-Wert zwischen 11 und 16 assoziiert. Im Gegenteil dazu haben Okamoto et al. gezeigt, dass auch Zuckerester mit niedrigem HLB-Wert den Transport beschleunigen können. Cazares-Delgadillo et al. haben den Einfluss von Saccharoselaureat und Saccharoseoleat auf den transdermalen Transport von Lidocain in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht [Cazares-Delgadillo et al. 2005]. Dabei konnten sie zeigen, dass Struktureigenschaften des Zuckeresters und Ionisierungsgrad der aktiven Substanz von entscheidender Bedeutung für den transdermalen Flux des von ihnen untersuchten Wirkstoffs sind. In ihrer Studie war Saccharoseoleat effektiver in der Permeationsbeschleunigung von Lidocain-Base, wobei Saccharoselaureat ein geeigneter Penetrationsenhancer für den protonierten Wirkstoff war.

In den eigenen Untersuchungen wurde Saccharosestearat (Ryoto Sugar Ester® S-1670, Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Japan) eingesetzt. Saccharosestearat ist bei Raumtemperatur ein weißes bis leicht gelbliches Pulver.

Tab. 7.4: Angaben zum Saccharosestearat

Zuckerester	HLB-Wert*	Stearinsäureanteil* [%]	Esterzusammensetzung* [%]	
			Monoester	Di-, Tri- und Polyester
Saccharosestearat S-1670	16	70	75	25

*Herstellerangaben [Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation 2003]

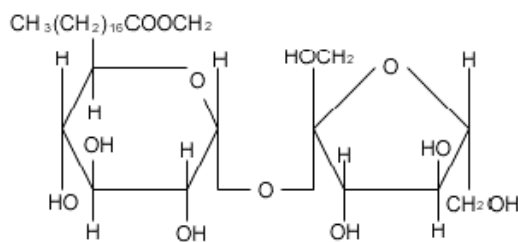


Abb. 7.1: Chemische Struktur von Saccharosemonostearat

7.2. Kompatibilität der aktiven Substanz mit den Enhancern

An erster Stelle wurde die Kompatibilität der aktiven Substanz mit dem Enhancer untersucht. Die Ergebnisse dazu wurden bereits in dem Kapitel 5.2 dargestellt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die ausgewählten potentiellen Transportbeschleuniger mit den Modellsubstanzen kompatibel sind.

7.3. Modellsubstanzen

In dieser Phase der Arbeit wurde die Anzahl der untersuchten Wirkstoffmodelle von den anfänglich in Phase I verwendeten sechs Wirkstoffen auf drei reduziert (Hydrocortison, Testosteron und Koffein), die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften wie Molmasse, Lipophilie und Löslichkeit unterscheiden.

Die Modellsubstanzen wurden in die Grundlagen in einer Konzentration von 0,1% inkorporiert. Somit blieb die Konzentration an Wirkstoff im Vergleich zu der Arbeitsphase I unverändert. Für Permeationsversuche mit Hydrocortison und Testosteron wurde die entsprechende Menge an radioaktivem Wirkstoff in die Grundlage eingearbeitet. Die Zielaktivität betrug 370 kBq/g. Bei den Versuchen mit Koffein wurden die Grundlagen auf Grund der niedrigeren Aktivität des Isotops auf den niedrigeren Wert von 46 kBq/g eingestellt. Die Einarbeitung der Wirkstoffe erfolgte manuell in der Fantaschale. Die Substanzen wurden mindestens 24 Stunden vor dem Versuchstart in die Formulierungen eingearbeitet. In dieser Zeit löst sich der Wirkstoff gleichmäßig in der Grundlage. Durch die Einarbeitung der Radioisotope befinden sich auch kleine Mengen an Toluol und Ethanol (max. 25 µL/g der Grundlage) in der Zubereitung, die selbst in der Lage sind, in dermalen Zubereitungen die Permeation von Stoffen durch das Stratum corneum zu fördern [Heard et al. 2006, Femenia-Font et al. 2005, Johnson et al. 1996].

7.4. Grundlagen

Die Experimente der Phase II wurden mit Formulierungen auf der Basis von Carbomergel durchgeführt. Das Carbomergel wurde als Grundlage für die Phase II auf Grund seiner

günstigen Transporteigenschaften von Corticosteroiden im Vergleich zu den beiden weiteren Grundlagen aus der Phase I (Wollwachsalkoholsalbe und Basiscreme) ausgewählt. Den Gelen wurde zusätzlich 2% (m/m) Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) zugesetzt, um die Einarbeitung von lipophilen Transportbeschleunigern in die hydrophile Grundlage zu ermöglichen ohne klassische Emulgatoren verwenden zu müssen. Die Herstellung dieser Grundlagen ist in Kapitel 10.14 beschrieben.

7.5. Charakterisierung der Grundlagen

Die in Phase II verwendeten Grundlagen wurden durch die Viskositätsmessung und pH-Wert Bestimmung charakterisiert.

7.5.1. Viskositätsbestimmung

Die Viskositätsbestimmungen wurden am Rotationsviskosimeter Rheotec GmbH durchgeführt (Kapitel 10.15). Um die plastische Viskosität der Grundlagen zu bestimmen, wurden die Fließkurven an die Herschel-Bulkley-Beziehung mit Hilfe der Rheometersoftware approximiert. Die Ergebnisse der Viskositätsmessung sind in der Tab. 7.5 und Abb. 7.2 dargestellt.

Tab. 7.5: Herschel-Bulkley plastische Viskosität der Grundlagen, n=3

Grundlage Nr.	Herschley-Bulkley plastische Viskosität [Pa·s]						t-Test
	n=1	n=2	n=3	MW	SD	RSD [%]	
G1 (Kontrolle)	56,23	72,50	68,79	65,84	6,96	10,57	-
G2	71,66	80,57	62,13	71,46	7,53	10,54	p>0,05
G3	97,93	106,32	103,25	102,50	3,47	3,38	p<0,05
G4	149,13	135,96	144,60	143,23	5,46	3,81	p<0,05
G5	75,84	69,01	77,73	74,19	3,75	5,05	p>0,05
G6	75,77	79,10	74,59	76,49	1,91	2,50	p>0,05
G7	85,38	80,43	82,10	82,64	2,05	2,49	p<0,05
G8	65,28	63,00	62,17	63,48	1,31	2,07	p>0,05
G9	62,20	68,96	63,48	64,88	2,93	4,52	p>0,05
G10	56,69	63,24	58,13	59,35	2,81	4,74	p>0,05
G11	84,06	95,67	92,28	90,67	4,88	5,38	p<0,05
G12	78,99	82,42	88,11	83,17	3,76	4,52	p<0,05
G13	104,34	101,02	101,72	102,36	1,43	1,39	p<0,05

Die plastische Viskosität der Kontrollgrundlage, die mit der Herschel-Bulkley-Gleichung ermittelt wird, lag bei $65,84 \pm 6,96$ Pa·s. Die niedrigste Konzentration an Isopropylmyristat

und die beiden niedrigsten Konzentrationen an Propylenglycol in der Grundlage erhöhten leicht (um ca. 12%) aber nicht signifikant die Viskosität der halbfesten Zubereitung. Ein Zusatz von 20% Propylenglycol (Grundlage G7) hat eine signifikante Erhöhung der Viskosität um 26% im Vergleich mit der Kontrolle verursacht, was mit den Ergebnissen von Mura et al. übereinstimmt [Mura et al. 2000]. Mura et al. haben eine leichte Viskositätszunahme beobachtet, wenn Propylenglycol in größeren Anteilen in das Hydrogel eingearbeitet wurde. Eine bedeutsame Viskositätssteigerung wurde für die Grundlage G3 und G4 gemessen, wobei sich die Viskosität ($143,23 \pm 5,46 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) in Zubereitung G4 durch die Einarbeitung von 20% Isopropylmyristat verdoppelt hat. Alle Zubereitungen, die Mischungen der Permeationsbeschleuniger Isopropylmyristat und Propylenglycol beinhalten, waren signifikant unterschiedlich von der Kontrollgrundlage ohne Permeationsanhaner. Der große Einfluss von IPM auf die rheologische Eigenschaften ist dadurch zu erklären, dass hier Emulsionssysteme entstehen. Diese bilden ein anderes rheologisches System. Die Einarbeitung von 1 bis 5% Saccharosestearat führte nicht zu einer signifikanten Änderung der rheologischen Eigenschaften der Grundlage.

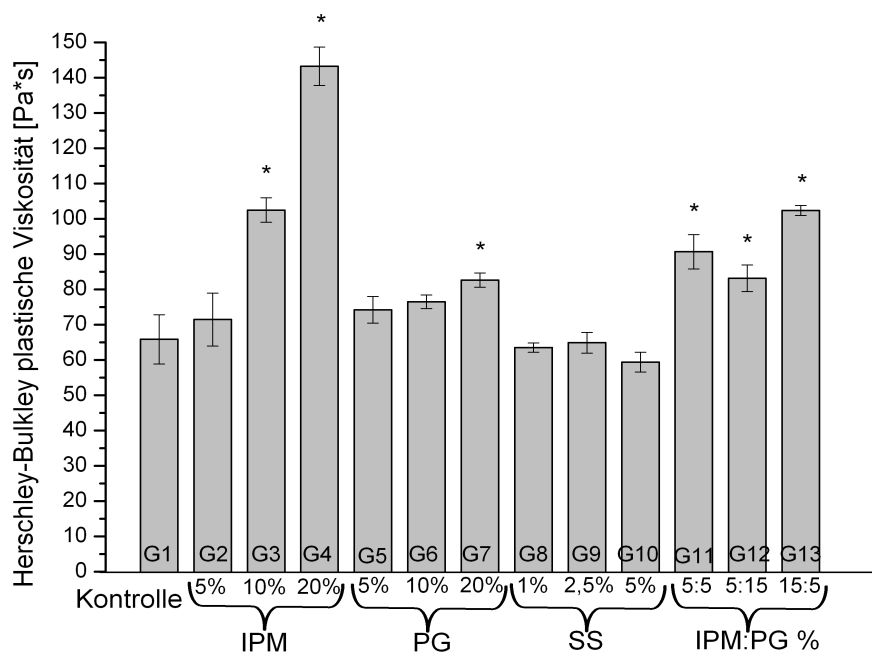


Abb. 7.2: Herschel-Bulkley plastische Viskosität der Grundlagen, * signifikant gegenüber Kontrolle mit $p < 0,05$

7.5.2. Bestimmung des pH-Werts

Die pH-Werte der 13 Grundlagen wurden bei Raumtemperatur in einer Dreifachbestimmung gemessen (Kapitel 10.13.2). Die Ergebnisse sind in Tab. 7.6 und Abb. 7.3 zusammengefasst.

Tab. 7.6: pH-Werte der Grundlagen, n=3

Grundlage Nr.	pH-Wert der Grundlage						t-Test
	n=1	n=2	n=3	MW	SD	RSD [%]	
G1 (Kontrolle)	6,21	6,2	6,19	6,20	0,01	0,13	-
G2	6,25	6,23	6,24	6,24	0,01	0,13	p<0,05
G3	6,12	6,1	6,11	6,11	0,01	0,13	p<0,05
G4	6,11	6,12	6,13	6,12	0,01	0,13	p<0,05
G5	6,28	6,28	6,26	6,27	0,01	0,15	p<0,05
G6	6,31	6,32	6,33	6,32	0,01	0,13	p<0,05
G7	6,48	6,46	6,46	6,47	0,01	0,15	p<0,05
G8	6,27	6,28	6,26	6,27	0,01	0,13	p<0,05
G9	6,25	6,24	6,23	6,24	0,01	0,13	p<0,05
G10	6,28	6,26	6,26	6,27	0,01	0,15	p<0,05
G11	6,33	6,31	6,31	6,32	0,01	0,15	p<0,05
G12	6,4	6,39	6,41	6,40	0,01	0,13	p<0,05
G13	6,29	6,28	6,27	6,28	0,01	0,13	p<0,05

Die Grundlagen wiesen einen pH-Wert von 6,11 bis 6,47 auf. Der gemessene pH-Wert aller modifizierten Grundlagen war signifikant jedoch nicht relevant unterschiedlich zum pH-Wert der Kontrolle.

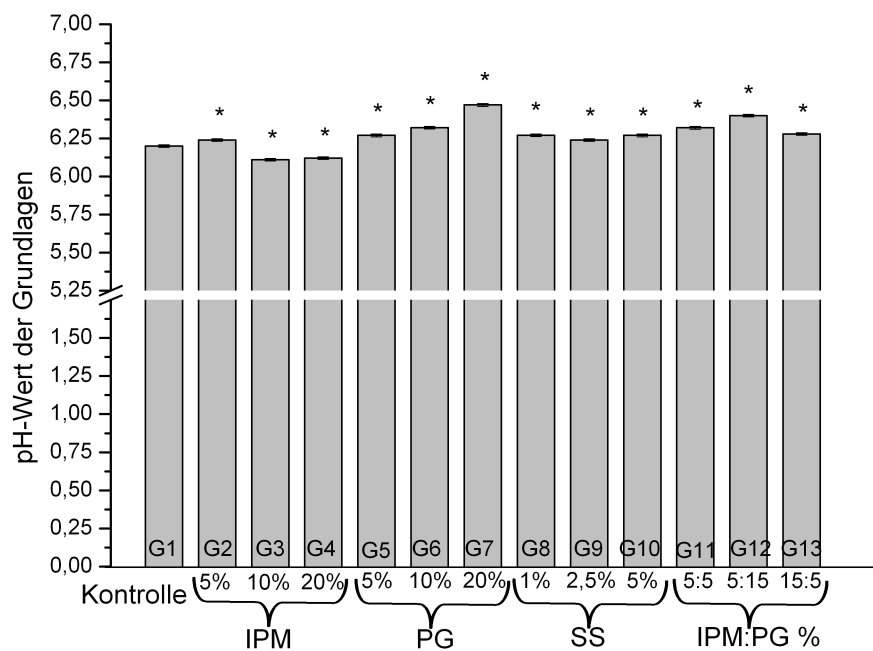


Abb. 7.3: pH-Wert der Grundlagen, * signifikant gegenüber Kontrolle mit p<0,05

7.6. Sättigungslöslichkeit in der Formulierung

Da das Carbomergel zum überwiegenden Teil (96,5%) aus Wasser besteht, kann die Löslichkeit des Wirkstoffs in dieser halbfesten Zubereitung durch seine Löslichkeit in Wasser angenähert werden. Im folgenden wurden die Sättigungslöslichkeiten der drei Modellsubstanzen in Wasser/Permeationsbeschleuniger-Mischungen untersucht, um die Löslichkeit in den 13 Grundlagen abzuschätzen (Kapitel 10.2.2). Das Ziel war, zu ermitteln, ob die Transportbeschleuniger die Löslichkeit der Testsubstanzen in den Zubereitungen erhöhen. Die Ergebnisse wurden auf statistische Unterschiede mit der Kontrolle (Sättigungslöslichkeit in reinem Wasser) verglichen (Tab. 7.7).

Tab. 7.7: Sättigungslöslichkeit in den Wasser/Permeationsbeschleuniger-Mischungen

Lösung	Hydrocortison		Testosteron		Koffein	
	MW \pm SD $\mu\text{g/mL}$	t-Test	MW \pm SD $\mu\text{g/mL}$	t-Test	MW \pm SD $\mu\text{g/mL}$	t-Test
Wasser (Kontrolle)	418,37 \pm 6,22	-	24,14 \pm 2,28	-	30083,60 \pm 403,27	-
IPM 100%	253,70 \pm 1,07	<0,05	555,61 \pm 14,79	<0,05	897,80 \pm 1,40	<0,05
PG 5%	438,60 \pm 5,48	<0,05	34,29 \pm 1,05	<0,05	37894,60 \pm 120,47	<0,05
PG 10%	629,73 \pm 6,87	<0,05	60,23 \pm 1,94	<0,05	38850,93 \pm 115,14	<0,05
PG 20%	972,67 \pm 6,14	<0,05	114,22 \pm 2,38	<0,05	32184,73 \pm 220,66	<0,05
SS 0,1%	374,83 \pm 2,25	<0,05	26,91 \pm 0,20	>0,05	22489,27 \pm 2,32	<0,05
SS 0,5%	390,93 \pm 4,99	<0,05	27,70 \pm 0,18	>0,05	24774,67 \pm 25,83	<0,05
SS 1%	582,07 \pm 5,08	<0,05	216,20 \pm 33,24	<0,05	30741,07 \pm 276,09	>0,05
SS 2,5%	915,17 \pm 0,71	<0,05	278,48 \pm 10,11	<0,05	24975,27 \pm 294,31	<0,05
SS 5%	1126,37 \pm 3,15	<0,05	345,14 \pm 6,49	<0,05	21514,00 \pm 54,34	<0,05
IPM/PG 5:5 %	497,30 \pm 1,96	<0,05	46,13 \pm 1,27	<0,05	23674,53 \pm 226,62	<0,05
IPM/PG 5:15%	716,00 \pm 3,82	<0,05	66,99 \pm 2,09	<0,05	24876,33 \pm 248,55	<0,05
IPM/PG 15:5%	504,50 \pm 3,21	<0,05	34,52 \pm 0,76	<0,05	29021,40 \pm 341,57	<0,05

Grafische Darstellungen der Ergebnisse finden sich in den Abb. 7.4-7.6. Der Wirkstoff wurde in einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/mL}$ in die Grundlagen eingearbeitet. Daher resultieren beim Koffein stets Lösungsgele. Testosteron liegt immer zu einem großen Anteil suspendiert vor. Hydrocortison liegt auch in nahezu allen Fällen als Suspension und nur in Gegenwart von 5% Saccharosestearat komplett gelöst vor.

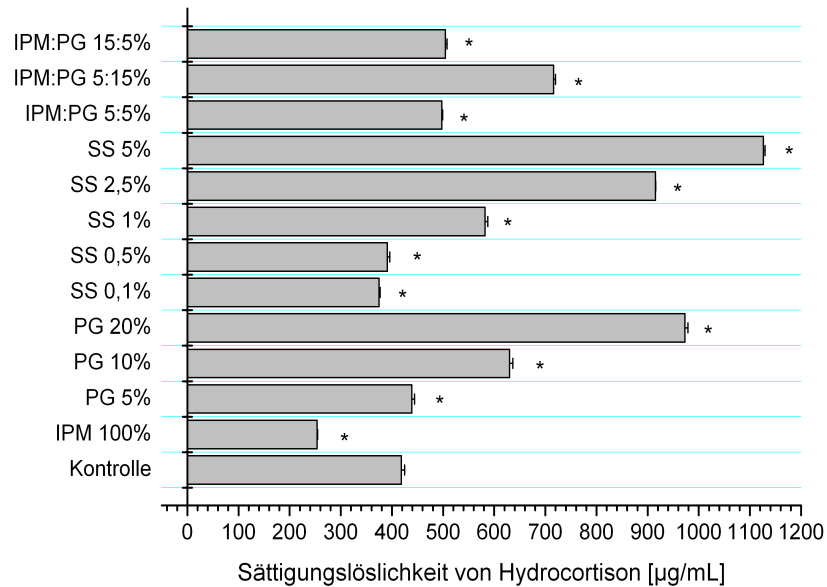


Abb. 7.4: Sättigungslöslichkeit von Hydrocortison in den Wasser/Penetrationsverbesserer-Mischungen, $n=3$, $\text{MW} \pm \text{SD}$, * signifikant gegenüber Kontrolle mit $p < 0,05$

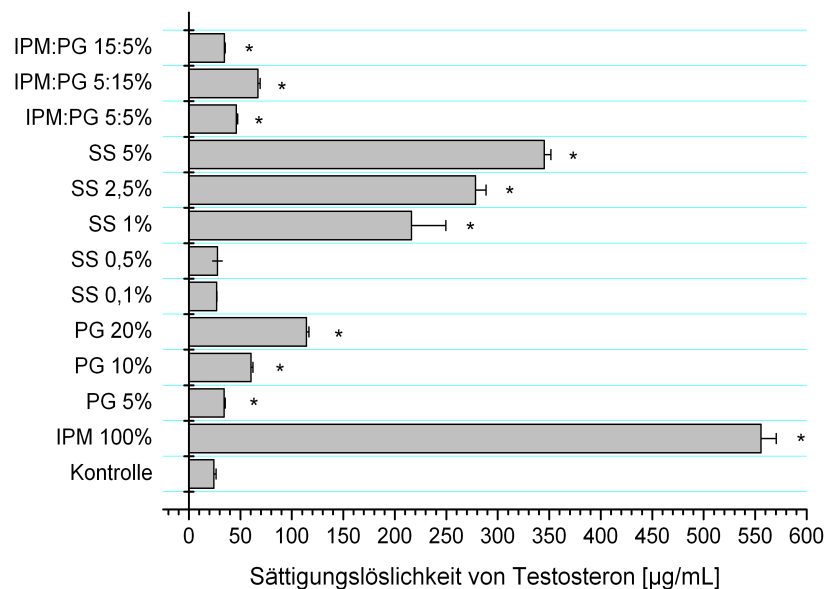


Abb. 7.5: Sättigungslöslichkeit von Testosteron in den Wasser/Penetrationsverbesserer-Mischungen, $n=3$, $\text{MW} \pm \text{SD}$, * signifikant gegenüber Kontrolle mit $p < 0,05$

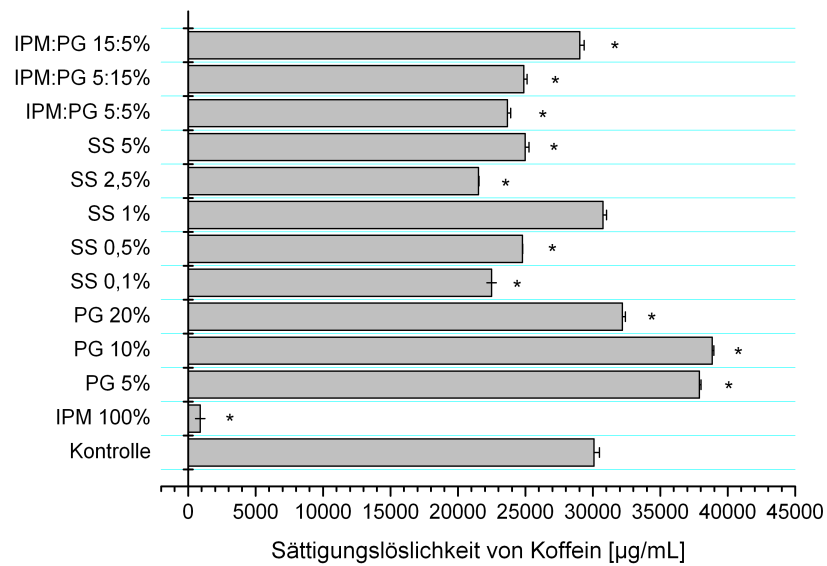
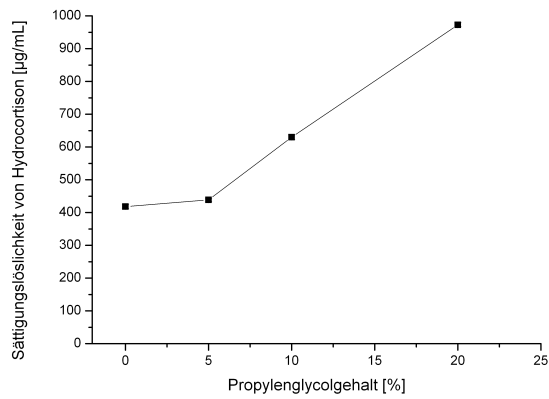
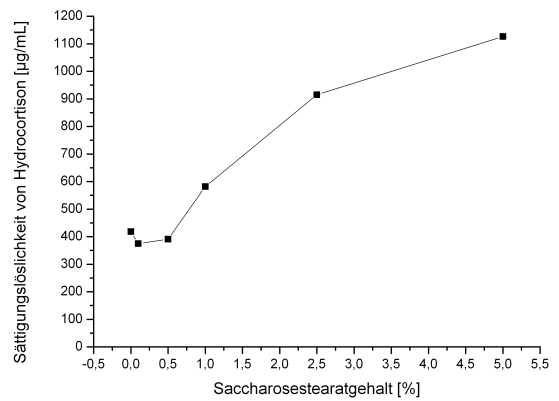


Abb. 7.6: Sättigungslöslichkeit von Koffein in den Wasser/Penetrationsverbesserer-Mischungen, $n=3$, $MW \pm SD$, * signifikant gegenüber Kontrolle mit $p < 0,05$

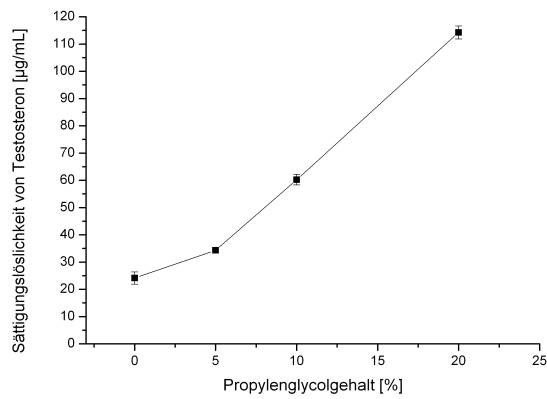
Die folgenden Grafiken (Abb. 7.7) zeigen die Veränderung der Löslichkeit in Abhängigkeit des prozentualen Gehalten der zwei Penetrationsverbesserer Propylenglycol und Saccharosestearat.



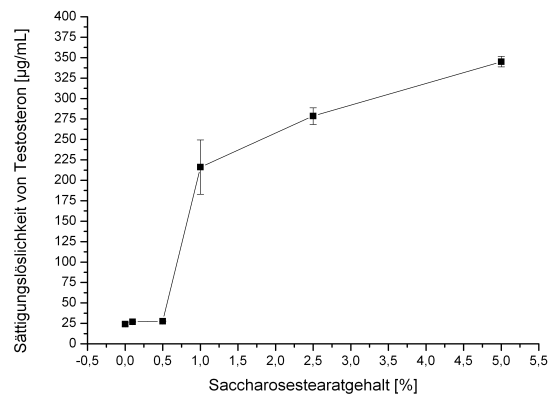
Hydrocortison (A)



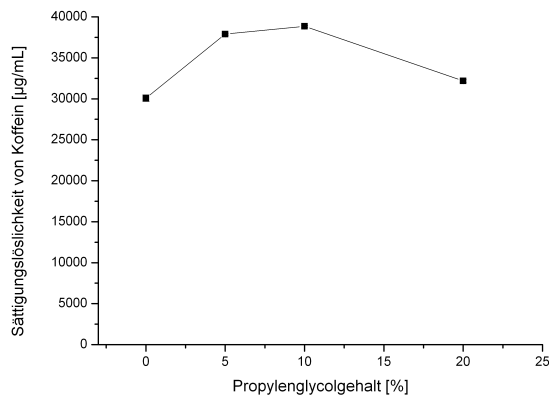
Hydrocortison (B)



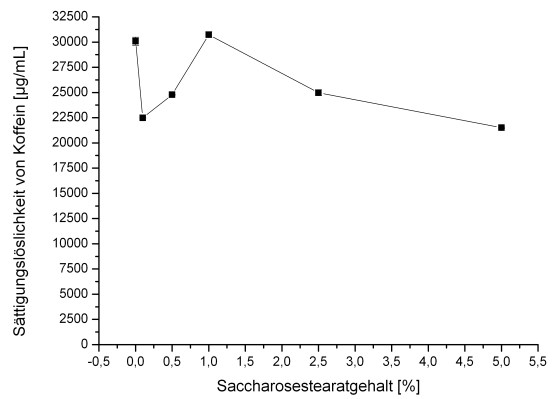
Testosteron (A)



Testosteron (B)



Koffein (A)



Koffein (B)

Abb. 7.7: Sättigungslöslichkeit der Modellsubstanzen bei unterschiedlichen Gehalten an Propylenglycol (A) und Saccharosestearat (B)

Propylenglycol

Propylenglycol erhöht proportional zu seiner steigenden Konzentration die Löslichkeit von Testosteron und Hydrocortison. Für einen 20%-prozentigen Zusatz an Propylenglycol wurde eine Löslichkeitsverbesserung um den Faktor von 4,73 für Testosteron und von 2,32 für Hydrocortison gemessen. Diese steigenden Werte der Löslichkeit von Hydrocortison mit steigender Konzentration an Propylenglycol stimmen mit den Beobachtungen von Krause überein. Die von Krause untersuchte Sättigungslöslichkeit von Hydrocortison in Wasser/Propylenglycol-Mischung 50:50 (v/v; %) liegt bei 2,93 mg/mL. Die Löslichkeit von Hydrocortison in reinem Propylenglycol wurde in deren Untersuchungen zu 14,67 mg/mL bestimmt [Krause 2001]. Im Vergleich mit Wasser erhöht Propylenglycol somit die Löslichkeit von Hydrocortison um ca. 35 [Florey 1986, Krause 2001].

Im Gegensatz zu den Steroiden wurde für das hydrophile Koffein ein anderes Verhalten beobachtet. Die Koffeidlöslichkeit steigt langsam in der 5%-igen Propylenglycol/Wasser-Mischung um den Faktor von 1,26 und in der 10%-igen Propylenglycol/Wasser-Mischung um den Faktor von 1,29. Auffällig ist, dass die höchste Propylenglycolkonzentration zu einer Löslichkeitsabnahme im Vergleich zu Mischungen mit 5% bzw. 10% Propylenglycolgehalt führt, was aber auch eine signifikante Löslichkeitsverbesserung verglichen zur Kontrolle brachte. Laut den Sättigungslöslichkeitsbestimmungen von Heard et al. löst sich in Wasser mehr als doppelte Menge von Koffein ($726,92 \text{ mg/cm}^3$) im Vergleich zu reinem Propylenglycol ($320,37 \text{ mg/cm}^3$) [Heard et al. 2006]. Der Vergleich mit den eigenen Ergebnissen gestaltet sich jedoch schwierig, da Heard et al. einen Extrakt aus Guarana benutzt hat, in dem zusätzlich neben Koffein Theobromin, Theophyllin und Catechin anwesend waren, die die Koffeidlöslichkeit beeinflussen können.

Isopropylmyristat

Isopropylmyristat mischt sich nicht mit Wasser; es bildet sich eine Emulsion. Somit wurde die Sättigungslöslichkeit nur in reinem Isopropylmyristat untersucht.

Die durch Krause bestimmte Hydrocortisonsättigungslöslichkeit in reinem Isopropylmyristat lag bei 0,23 mg/mL [Krause 2001]. Dieser Wert liegt unter dem Wert für die Hydrocortisonwasserlöslichkeit und stimmt mit dem Ergebnis der eigenen Untersuchungen überein. Isopropylmyristat konnte das Testosteron um einen Faktor von ca. 23 besser als Wasser lösen. Für Koffein wurde im Isopropylmyristat eine Löslichkeitsabnahme um einen Faktor von ca. 34 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet, was durch den hydrophilen Charakter der Substanz verursacht wird (Log P von $-0,08$). Das Ergebnis für Koffein steht im

Einklang mit den Löslichkeitsbestimmungen von Nicoli et al.. Die von ihnen bestimmte Löslichkeit von Koffein in reinem Isopropylmyristat liegt bei $0,99 \pm 0,07$ mg/mL [Nicoli et al. 2005].

Saccharosestearat

Laut den Herstellerangaben ist das Saccharosestearat in Wasser bei 25 °C und 75 °C löslich [Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation 2003]. Bei den hier ausgewählten Konzentrationen an Saccharosestearat hat sich jedoch eine leicht milchige Dispersion gebildet, die sich mit der Zeit abgesetzt hat. Aus diesem Grund wurde die Sättigungslöslichkeit der Wirkstoffe zusätzlich bei zwei niedrigeren Konzentrationen Saccharosestearat (0,1 und 0,5%) gemessen. Saccharosestearat steigert die Löslichkeit von Hydrocortison und Testosteron durch Mizelleinschluss. Mit steigender Zuckeresterkonzentration steigt die Löslichkeit von Hydrocortison und Testosteron, wobei für Hydrocortison die Sättigungslöslichkeit in den Mischungen mit den beiden niedrigsten Konzentrationen an Saccharosestearat unterhalb der Wasserlöslichkeit liegt. Die Mischung mit 5% Saccharosestearat konnte die größte Hydrocortisonmenge solubilisieren und die Testosteronlöslichkeit um den Faktor 14,30 verbessern. Im Gegensatz dazu hat der Zuckerester andere Effekte auf die Löslichkeit des hydrophilen Koffeins verursacht. Die höchste Koffeinlöslichkeit wurde in 1%-iger Saccharosestearat/Wasser-Mischung beobachtet, wobei dieser Wert mit der Wasserlöslichkeit von Koffein vergleichbar ist. Sowohl niedrigere als auch höhere Konzentrationen Saccharosestearat führen zu einer Löslichkeitsabnahme von Koffein gegenüber der rein wässrigen Lösung.

Isopropylmyristat/Propylenglycol-Mischungen

Eine Interpretation und Einordnung der Ergebnisse der Sättigungslöslichkeit in den Isopropylmyristat/Propylenglycol/Wasser-Mischungen gestaltet sich schwierig, da sich ebenfalls Emulsionen gebildet haben. Für Hydrocortison und Testosteron wurde für alle Mischungen eine signifikante Erhöhung der Löslichkeit im Vergleich zu rein wässrigen Lösungen beobachtet, wobei die höchste Löslichkeit für beide Wirkstoffe im System mit dem höchsten Propylenglycolgehalt bestimmt wurde. Für Koffein liegen die gemessenen Werte für alle drei Mischungen unter der Sättigungslöslichkeit im Wasser. Die höchste Löslichkeit wurde hier für Isopropylmyristat/Propylenglycol-Mischung 15:5 (v/v; %) bestimmt.

7.7. Permeationsuntersuchungen

Die Ergebnisse des Massentransportes über die untersuchten hitzeseptierten Epidermis nach 6 und 24 Stunden sind in den Tab. 7.8-7.9 aufgelistet.

Tab. 7.8: Massentransport nach 6 h

Formulierung	Hydrocortison		Testosteron		Koffein	
	MW ± SD	t-Test	MW ± SD	t-Test	MW ± SD	t-Test
	dpm		dpm		dpm	
G1 (Kontrolle)	132 ± 13	-	1463 ± 78	-	326 ± 130	-
G2	107 ± 40	p>0,05	1176 ± 88	p<0,05	255 ± 50	p>0,05
G3	155 ± 53	p>0,05	1263 ± 131	p>0,05	247 ± 47	p>0,05
G4	124 ± 41	p>0,05	1575 ± 257	p>0,05	414 ± 107	p>0,05
G5	146 ± 79	p>0,05	1448 ± 106	p>0,05	174 ± 29	p>0,05
G6	154 ± 105	p>0,05	1728 ± 241	p>0,05	211 ± 67	p>0,05
G7	76 ± 22	p>0,05	1571 ± 202	p>0,05	134 ± 24	p<0,05
G8	95 ± 19	p>0,05	1047 ± 243	p<0,05	229 ± 23	p>0,05
G9	53 ± 18	p<0,05	1154 ± 123	p<0,05	200 ± 18	p>0,05
G10	78 ± 52	p>0,05	631 ± 92	p<0,05	209 ± 43	p>0,05
G11	91 ± 26	p>0,05	1058 ± 146	p<0,05	209 ± 58	p>0,05
G12	75 ± 22	p<0,05	934 ± 332	p<0,05	116 ± 24	p<0,05
G13	257 ± 141	p>0,05	1297 ± 163	p>0,05	285 ± 95	p>0,05

Tab. 7.9: Massentransport nach 24 h

Formulierung	Hydrocortison		Testosteron		Koffein	
	MW ± SD	t-Test	MW ± SD	t-Test	MW ± SD	t-Test
	dpm		dpm		dpm	
G1 (Kontrolle)	804 ± 148	-	6348 ± 130	-	1679 ± 119	-
G2	1310 ± 355	>0,05	6659 ± 868	>0,05	2307 ± 244	<0,05
G3	1760 ± 290	<0,05	7683 ± 1056	>0,05	2274 ± 162	<0,05
G4	1814 ± 216	<0,05	8118 ± 535	<0,05	5760 ± 916	<0,05
G5	719 ± 183	>0,05	6421 ± 383	>0,05	1436 ± 63	<0,05
G6	1333 ± 251	>0,05	8043 ± 1245	>0,05	1293 ± 269	>0,05
G7	232 ± 77	<0,05	8312 ± 448	<0,05	727 ± 169	<0,05
G8	338 ± 151	<0,05	5622 ± 897	>0,05	2183 ± 223	<0,05
G9	437 ± 114	<0,05	6034 ± 695	>0,05	1542 ± 294	>0,05
G10	284 ± 66	<0,05	3433 ± 575	<0,05	1794 ± 286	>0,05
G11	918 ± 352	>0,05	6199 ± 618	>0,05	1248 ± 106	<0,05
G12	368 ± 155	<0,05	6969 ± 400	<0,05	587 ± 133	<0,05
G13	1553 ± 111	<0,05	7597 ± 460	<0,05	2096 ± 256	<0,05

Abbildung 7.8 präsentiert beispielhaft den Testosterontransport über hitzeseparierte Epidermis aus dem Carbomergel aus der experimentellen Phase I und II. Diese Abbildung begründet die Auswahl der zwei repräsentativen Probenentnahmezeitpunkten für den Wirkstofftransport nach 6 und 24 Stunden in der Optimierungsphase.

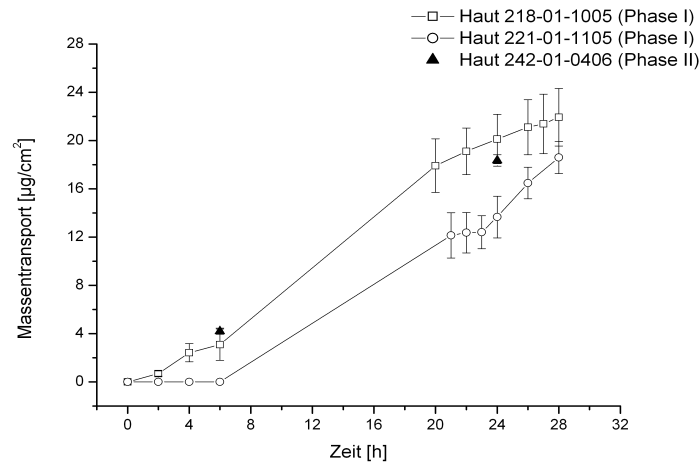


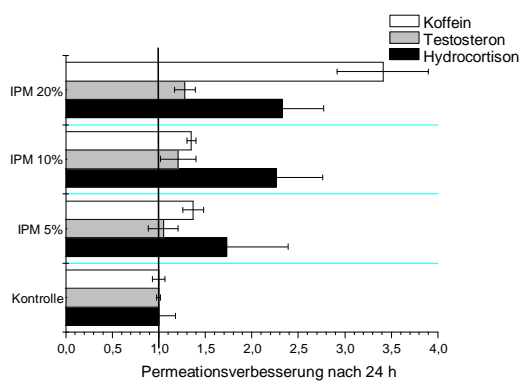
Abb. 7.8: Testosterontransport aus dem Carbomergel in der experimentellen Phase I und II

Nach sechs Stunden waren die Unterschiede in der Permeationsrate zwischen den untersuchten Formulierungen marginal. Aus diesem Grund werden in der weiteren Diskussion nur die Werte nach 24 Stunden in Betracht gezogen.

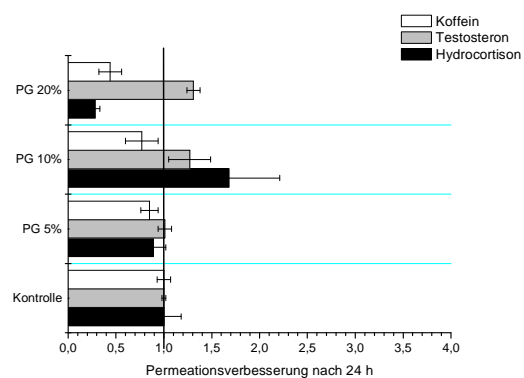
Um die aus den modifizierten Formulierungen erhaltenen Ergebnisse mit der Kontrolle einfacher vergleichen zu können, wurde das Verhältnis der Permeationsbeschleunigung nach 24 Stunden berechnet (Kapitel 10.12.2). Die Ergebnisse sind in Tab. 7.10 und Abb. 7.9 dargestellt.

Tab. 7.10: Verhältnis der Permeationsbeschleunigung (MW) nach 24 Stunden

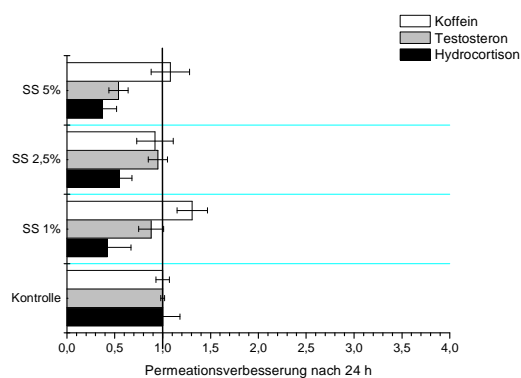
Formulierung	Hydrocortison			Testosteron			Koffein		
	MW	SD	RSD	MW	SD	RSD	MW	SD	RSD
G1 (Kontrolle)	1,00	0,18	18,38	1,00	0,02	2,05	1,00	0,07	7,10
G2	1,73	0,66	37,97	1,05	0,16	14,92	1,37	0,11	8,11
G3	2,26	0,50	22,17	1,21	0,19	15,25	1,35	0,05	3,79
G4	2,33	0,44	19,09	1,28	0,11	8,44	3,41	0,49	14,16
G5	0,89	0,13	14,10	1,01	0,07	7,23	0,85	0,09	10,34
G6	1,68	0,53	31,81	1,27	0,22	16,99	0,77	0,17	22,53
G7	0,28	0,05	18,88	1,31	0,07	5,21	0,44	0,12	26,58
G8	0,42	0,25	58,61	0,88	0,13	14,61	1,31	0,16	12,61
G9	0,55	0,13	23,63	0,95	0,10	10,30	0,92	0,19	20,89
G10	0,37	0,15	40,23	0,54	0,10	18,70	1,08	0,20	18,24
G11	1,16	0,38	32,40	0,98	0,11	10,78	0,75	0,08	10,13
G12	0,48	0,24	49,18	1,10	0,08	7,40	0,35	0,09	26,35
G13	1,81	0,18	9,70	1,20	0,05	4,08	1,26	0,19	15,18



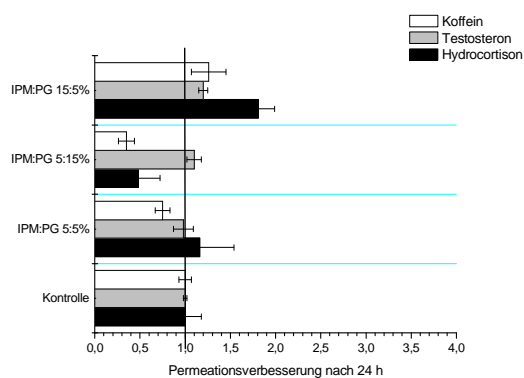
IPM-Formulierungen



PG-Formulierungen



SS-Formulierungen



IPM/PG-Formulierungen

Abb. 7.9: Permeationsbeschleunigungsverhältnis nach 24 Stunden

Im folgenden werden die Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen für die Testsubstanzen einzeln beschrieben und anschließend diskutiert.

7.7.1. Hydrocortison

Die Ergebnisse des Hydrocortisontransportes aus den in der Phase II modifizierten Grundlagen sind in Abb. 7.10 dargestellt.

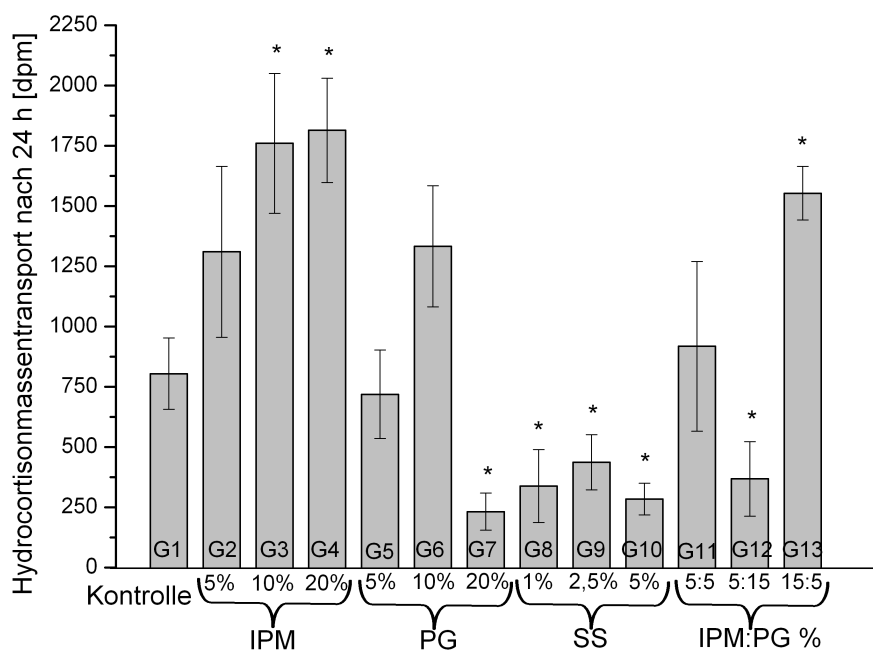


Abb. 7.10: Hydrocortisonmassentransport nach 24 h, n=4, MW ± SD,* signifikant gegenüber Kontrolle mit p<0,05

Die höchste Permeationsrate für Hydrocortison wurde aus der Formulierung G4 beobachtet, die 20% Isopropylmyristat enthält. Generell wurde mit steigender Konzentration an Isopropylmyristat in der Formulierung eine wachsende Tendenz in der Wirkstofftransportrate über die Haut erhalten, wobei nur die Formulierung G3 und G4 signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle lieferten. Die Formulierung G5 mit der niedrigsten Konzentration an Propylenglycol war in der Transportrate nahezu vergleichbar mit der Kontrolle. Die mittlere Propylenglycolkonzentration (10%) verbesserte die Permeation von Hydrocortison um den Faktor 1,60. Diese Verbesserung war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Isopropylmyristat führte die höchste Propylenglycolkonzentration zur Hydrocortisontransportverschlechterung um den Faktor 0,72. Eine ähnliche Situation spiegelte sich auch bei den Mischungen dieser beiden Permeationsenhancer wider. Die Formulierung mit 5% Isopropylmyristat und 5%

Propylenglycol brachte eine leichte, nicht signifikante Permeationsverbesserung um den Faktor 1,10. Bei dem überwiegenden Anteil von Isopropylmyristat in der Formulierung G13 war die Permeationsbeschleunigung signifikant zur Kontrolle. Für die Formulierung G12, in welcher der Propylenglycolanteil überwiegt, wurde eine Verschlechterung des Massentransports beobachtet. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die Formulierung G7 mit 20% Propylenglycol.

Alle in den Formulierungen angewandten Konzentrationen an Saccharosestearat führten zu einer signifikanten Verringerung im Hydrocortisontransport. Die höchste Transporterniedrigung wurde für die 5%ige Saccharosestearat-Konzentration festgestellt. Dieser Wert liegt um einen Faktor von 0,66 niedriger im Vergleich zur Formulierung ohne Permeationsenhancer.

7.7.2. Testosteron

Die Ergebnisse der Testosteronpermeation aus den in Phase II modifizierten Vehikeln über hitzeseparierte Epidermis sind in Abb. 7.11 zusammengefasst.

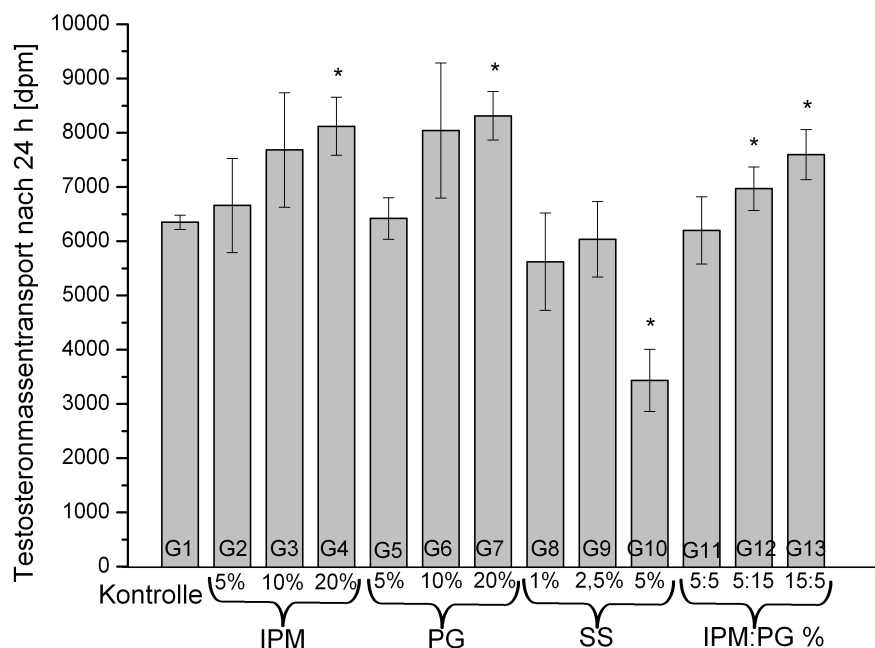


Abb. 7.11: Testosteronmassentransport nach 24 h, n=4, MW \pm SD, * signifikant gegenüber Kontrolle mit $p < 0,05$

Für Testosteron stieg der transdermale Transport mit steigender Konzentration von Isopropylmyristat und Propylenglycol an. Signifikante Unterschiede wurden jedoch nur für die jeweils höchste Konzentration dieser Permeationsbeschleuniger festgestellt. Bei 20%

Isopropylmyristat bzw. Propylenglycol in den Formulierungen G4 und G7 lag die Transportrate im Vergleich zur Kontrolle um das 1,3-fache höher. Ein vergleichbarer Effekt wurde bei den Formulierungen G11-13 beobachtet, die Mischungen der beiden Permeationsenhancer Isopropylmyristat und Propylenglycol beinhaltete. Die Transportverbesserung war nur im Fall der Formulierungen mit 15%igem Anteil an Permeationsbeschleuniger (G12 und G13) signifikant.

Die Einarbeitung des Zuckeresters führte in keinem Fall zu einer Erhöhung der Permeationsrate von Testosteron. Der Transport aus der Formulierung G8 und G9 war vergleichbar mit der Kontrollformulierung. Die Formulierung G10 mit der höchsten Konzentration an Saccharosestearat ergab etwa die halbe Transportrate verglichen mit der Kontrolle.

7.7.3. Koffein

Die Ergebnisse der Permeation von Koffein aus den in Phase II modifizierten Grundlagen sind in Abb. 7.12 dargestellt.

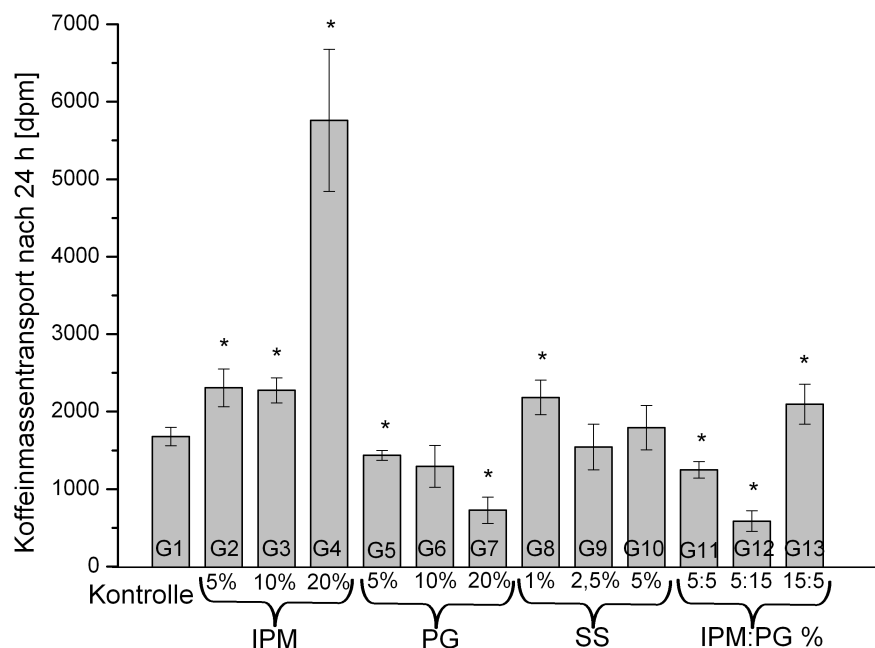


Abb. 7.12: Koffeinmassentransport nach 24 h, n=4, MW \pm SD, * signifikant gegenüber Kontrolle mit $p < 0,05$

Die Koffeinpermeation wurde durch die Einarbeitung von 20% Isopropylmyristat in die Grundlage um den Faktor von 3,41 im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Auch die niedrigeren Konzentrationen an Isopropylmyristat in den Formulierungen G2 und G3 führten

zu einer signifikanten Transportverbesserung von Koffein. Der Einfluss von Isopropylmyristat war jedoch nicht linear. Propylenglycol verbesserte die Permeation des Koffeins nicht. Die Permeation von Koffein aus den Formulierungen mit 5 und 10% Propylenglycol war geringfügig niedriger als aus der Kontrollformulierung. Die höchste Konzentration an Propylenglycol in der Formulierung G7 verschlechterte den Transport über die Haut signifikant (Faktor 0,57). Eine vergleichbare Verschlechterung (Faktor 0,66) wurde bei den Mischungen von Isopropylmyristat und Propylenglycol beobachtet, bei denen Propylenglycol den höchsten Anteil (15%) an der Mischung hatte. Im Gegensatz hierzu wurde die Koffeintransportrate erhöht, wenn Isopropylmyristat in der Mischung (Formulierung G13) dominierte. Diese Permeationsverbesserung war nicht so evident wie im Fall des reinen Isopropylmyristats in der Formulierung G4. Der gleiche, 5%ige Anteil an Isopropylmyristat und Propylenglycol in der Zubereitung G11 resultierte in einer Transportverschlechterung um einen Faktor 0,19.

Die Formulierung G8, die 1% Saccharosestearat enthält, verbesserte die Koffeinpermeation um den Faktor 1,29. Bei den zwei weiteren Formulierungen mit den höheren Konzentration an Zuckerester war der Unterschied zur Kontrolle nicht so ausgeprägt.

7.8. Zusammenfassung und Diskussion

Auf Grund der sehr guten Barriereeigenschaften der Haut ist in vielen Fällen der Zusatz eines geeigneten Transportbeschleunigers zum Vehikel notwendig. Der beobachtete Effekt der untersuchten potentiellen Transportbeschleuniger auf die Permeation der drei Modellsubstanzen: Hydrocortison, Testosteron und Koffein, war substanzspezifisch und konzentrationsabhängig. Propylenglycol, Isopropylmyristat und Saccharosestearat haben in einigen Fällen eine Permeationsverbesserung, in anderen Fällen eine Transporthemmung verursacht.

Saccharosestearat

Häufig müssen hohe Konzentrationen transportfördernder Substanzen im Vehikel vorhanden sein, um die Transportrate eines Wirkstoffs relevant zu erhöhen. Beim Einarbeiten von Permeationsenhancern in Formulierungen ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine Hautreizung umso wahrscheinlicher ist, je höher die Konzentration an Permeationsenhancer ist. Aus diesem Grund erscheinen die Zuckerester von großem Interesse, da diese nicht toxisch sowie nicht hautreizend wirken und in niedrigen Konzentrationen in die Grundlage eingearbeitet werden können.

Das in dieser Arbeit untersuchte Saccharosestearat führte in den meisten Fällen zur Verringerung der Transportrate der untersuchten Modellsubstanzen. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Van den Bergh et al. und Keipert und Schulz. Van den Bergh et al. haben in ihrer Studie demonstriert, dass Behandlung der Haut mit einem Saccharosestearat beinhaltenden Vehikel keine Veränderung der Ultrastruktur der Haut sowie auch keine Änderung der Hautpermeation verursacht [Van den Bergh et al. 1999]. Keipert und Schulz stellten in ihren Untersuchungen sogar eine verzögerte Freisetzung aus Mikroemulsionen auf Saccharoseesterbasis fest [Keipert und Schulz 1994].

Die nachgewiesene Permeationsverzögerung für Testosteron und Hydrocortison aus der Formulierungen mit Saccharosestearat lässt einen partiellen Einbau der Wirkstoffe in mizellare Strukturen vermuten. Dafür spricht auch die bedeutsame Erhöhung der Löslichkeit dieser Wirkstoffe in Anwesenheit des Zuckeresters. Die Wirkung eines nichtionischen Tensids als Permeationsverbesserer hängt im Wesentlichen von zwei Faktoren ab: von seinen Wechselwirkungen mit der Haut sowie mit dem Wirkstoff selbst. Es ist bekannt, dass die Zuckerester in Wasser und in organischen Lösungen Mizellen bilden [Ayala-Bravo et al. 2003]. Dadurch kommt es zu einem mizellaren Einschluss des Wirkstoffs, was einerseits zur seiner Löslichkeitserhöhung im Vehikel, aber andererseits zur Reduzierung des Anteils an freier Substanz führt. Wenn der Wirkstoff durch Mizellbildung solubilisiert wird, dann wird der Wirkstofftransport alleine auf Grund des ungünstigen Verteilungskoeffizienten zwischen Mizellen und dem Vehikel sowie der niedrigeren thermodynamischen Aktivität reduziert [Ayala-Bravo et al. 2003]. Die durch Ayala-Bravo et al. gemessene kritische Mizellbildungskonzentration lag im Wasser bei 0,05% für Saccharoselaureat und bei 0,01% für Saccharoseoleat. Die erwartete kritische Mizellbildungskonzentration für das Saccharosestearat sollte sich in einem ähnlichen Konzentrationenbereich befinden, was durch eigene Bestimmung der CMC von 0,008% bestätigt wurde. Somit überschreitet schon die niedrigste in den Formulierungen aus der Phase II verwendete Konzentration an Saccharosestearat (1%) die kritische Mizellbildungskonzentration. Das könnte die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit klären. Im Gegensatz zu dieser Hypothese stellten Vermeire et al. fest, dass ein Hydrogel mit 15% Saccharoselaureat zur Erhöhung des transdermalen Transports von Östradiol führt [Vermeire et al. 1996].

Saccharosestearat erhöhte nur die Aufnahme der hydrophilen Modellsubstanz Koffein, das eine niedrigere Tendenz zur Einlagerung in Mizellen aufweist. Das Konzentrationsoptimum lag für die Transportbeschleunigung von Koffein bei 1% Zuckerester, was mit den Ergebnissen der Löslichkeitsbestimmung korreliert (siehe Kap. 7.6).

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass Saccharosestearat in den drei hier untersuchten Konzentrationen nahezu für alle Wirkstoffmodelle keine Erhöhung der Transportrate oder sogar einen verzögernden Effekt auf den Transport durch die Haut verursacht.

Isopropylmyristat und Propylenglycol

Als Hauptursache für die gemessenen Effekte bezüglich der Transporterhöhung durch Isopropylmyristat und Propylenglycol werden sowohl die penetrationsfördernde Wirkung der eingesetzten Permeationsbeschleuniger als auch die Erhöhung der Sättigungslöslichkeit durch ihre lösungsvermittelnden Eigenschaften angesehen. Der zweite Faktor wurde durch die Löslichkeitsbestimmungen in den Grundlagen nachgewiesen (siehe Kap. 7.6). Endgültige Aussagen hierzu müssten allerdings entsprechende in vitro Penetrationsstudien erbringen. Isopropylmyristat ist ein typisches Beispiel für einen chemischen Transportbeschleuniger, der interkalierend in die Lipiddoppelschichten eingebaut wird und deren dichte Packung stört, wodurch die Diffusionsgeschwindigkeit steigt [Daniels 2004]. Propylenglycol kann einerseits zur Erhöhung der Wirkstofflöslichkeit in der Grundlage führen. Andererseits kann diese Substanz durch Eigenpenetration in die Haut den Wirkstoff mittransportieren bzw. den Verteilungskoeffizienten verändern. Im Falle des Testosterons wurde eine deutlich höhere Löslichkeit in Propylenglycol als in Wasser nachgewiesen (siehe Kap. 7.6), was für einen Effekt in der Zubereitung auf Grund der lösungsvermittelnden Eigenschaften von Propylenglycol spricht.

Isopropylmyristat und Propylenglycol haben für Testosteron die beste Wirkung bezüglich der Permeationsbeschleunigung gezeigt. Diese Beobachtung steht für Isopropylmyristat in einer guten Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Leichtnam et al., in denen Isopropylmyristat als der effektivste Transportverbesserer von Testosteron aus einer Sprayformulierung identifiziert wurde [Leichtnam et al. 2006]. In der gleichen Arbeit wurde aber eine retardierende Wirkung für Propylenglycol festgestellt, wenn die Haut damit vorbehandelt wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass der in dieser Arbeit beobachtete transportfördernde Effekt von Propylenglycol hauptsächlich auf der Löslichkeitserhöhung von Testosteron in der Zubereitung basiert.

Der Effekt, den Propylenglycol auf den Transport von Testosteron ausübt, stimmt nicht mit dem Verhalten von Hydrocortison überein. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nämlich eine starke Abnahme der Transportrate beim höchsten Gehalt an Propylenglycol in der Zubereitung beobachtet. Beim transdermalen Transport von lipophilen Wirkstoffen beeinflusst nicht nur das Eindringen ins Stratum corneum die Transportgeschwindigkeit, sondern auch das Verlassen der bevorzugten lipophilen Hautschichten behindert den weiteren

Transport durch die hydrophile lebende Epidermis und Dermis [Leichtnam et al. 2006]. In einem solchen Fall kann ein lipophiler Transportenhancer sowohl die Diffusion in die Hornschicht erleichtern, als auch die Löslichkeit sowie die Verteilung der Substanz im Stratum corneum erhöhen, was einen retardierenden Effekt verursachen kann. Dies könnte eine Erklärung für die Verschlechterung der Transportrate von Hydrocortison, das für Depotbildung im Stratum corneum bekannt ist, in Gegenwart der höchsten Konzentration an Propylenglycol sein.

Faergemann et al. stellten fest, dass die Einarbeitung von 25% Propylenglycol in die von ihnen untersuchte Formulierung in einer um den Faktor 13 erhöhten Permeationsrate von Hydrocortison resultiert [Faergemann et al. 2005], was allerdings nicht durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte. Da jedoch in diesen beiden Untersuchungen unterschiedliche Einzelkomponenten der Grundlagen und unterschiedliche Konzentrationen an aktiver Substanz verwendet wurden, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Faergemann et al. zeigten Müller-Goymann und Alberg, dass eine kommerzielle Formulierung mit Propylenglycol im Vergleich zu einer wasserhaltigen hydrophilen Salbe niedrigere Permeabilitätsraten liefern kann [Müller-Goymann und Alberg 1999].

Bei 5 und 10%igen Konzentrationen an Propylenglycol im Vehikel liegen Suspensionsalben mit Hydrocortison vor, was die Löslichkeitsexperimente belegen. Bei einem Zusatz von 20% Propylenglycol nimmt die thermodynamische Aktivität ab, was die Reduktion der Permeationsrate klären könnte. In diesem Fall wird eine Lösungsformulierung gebildet. Die Transportverschlechterung ist dann auf die niedrigere Effizienz einer Lösungssalbe im Vergleich zu einer Suspensionssalbe zurückzuführen [Malzfeldt et al. 1989].

Eine andere Ursache für die Transporthemmung könnte die Erhöhung der Hydrocortisonaffinität zu dem Vehikel sein, was Arellano et al. bei ihren Untersuchungen mit Diclofenac Natrium beobachteten [Arellano et al. 1998]. Diese Erklärung erscheint jedoch in der vorliegenden Versuchsreihe unwahrscheinlich, da dieser Effekt für Testosteron nicht beobachtet werden konnte.

Isopropylmyristat scheint ebenfalls ein geeigneter Permeationsbeschleuniger für den Hydrocortisontransport zu sein. Hinweise darauf wurden bereits in der Literatur, unter anderen in den Untersuchungen von Refai und Müller-Goymann, beschrieben [Refai und Müller-Goymann 2002]. Die Wirkung des Isopropylmyristats als Lösungsvermittler kann ausgeschlossen werden, wie die eigenen Bestimmungen der Sättigungslöslichkeit von Hydrocortison belegen.

Keine Permeationsverbesserung konnte für das hydrophile Koffein nachgewiesen werden, wenn Propylenglycol in der Zubereitungen (ohne Isopropylmyristat) anwesend war. Diese Beobachtungen korrelieren gut mit den Ergebnissen einer Studie von Barry, die einen weniger ausgeprägten Propylenglycolenhancereffekt auf die Penetration von hydrophilen Substanzen und Wirkstoffen mit einem hohen Verteilungskoeffizient zwischen der Hornschicht und dem Vehikel beschreibt [Barry und Bennett 1987]. Das für Koffein beobachtete Verhalten stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen von Heard et al. überein, die eine höhere Absorptionsrate von Koffein aus einem wässrigen Vehikel im Vergleich zu Propylenglycol gemessen haben [Heard et al. 2006].

Bei der Interpretation der Ergebnisse mit inkorporiertem Isopropylmyristat muss berücksichtigt werden, dass sich Koffein, auf Grund seines hydrophilen Charakters, in höherer Konzentration in der wässrigen Phase als in Isopropylmyristat löst. Hierfür sprechen die Ergebnisse der Versuche zur Sättigungslöslichkeit (s. Kap. 4.2). Dabei kann von einer nahezu vollständigen Verteilung des Koffeins in der wässrigen Phase der Formulierung ausgegangen werden. Aus dieser kann eine bevorzugte Freigabe des Wirkstoffs erfolgen, was zu einer höheren Permeationsrate aus den Formulierungen mit Zugabe von Isopropylmyristat führen kann. Dies sollte jedoch zu einer linearen Konzentrationsabhängigkeit führen, was allerdings nicht der Fall ist. Eine weitere Erklärung des permeationsfördernden Effektes von Isopropylmyristat für Koffein liegt vermutlich darin, dass dieser Fettsäureester die dichte Struktur der Hornschicht stört. Dies könnte den Transport von Koffein fördern, da bekanntermaßen für das hydrophile Koffein das lipophile Stratum corneum die größte Barriere bei dem Transport über die Hautschichten bildet.

Aus den Ergebnissen der Untersuchungen mit Isopropylmyristat und Propylenglycol ist ersichtlich, dass diese beide potentielle Permeationsbeschleuniger unterschiedliche Effekte auf den Transport der drei Modellsubstanzen durch die Haut ausüben.

Isopropylmyristat/Propylenglycol-Mischungen

In der Literatur wird häufig eine effektivere Wirkung von einem Penetrationsverbesserer in Gegenwart eines sogenannten Coenhancers beschrieben [Bonina et al. 1993, Arellano et al. 1998, Mura et al. 2000, Larrucea et al. 2001, Barry 2001, Karande et al. 2004, Gorukanti et al. 1999, Gwak et al. 2002, Simonsen et al. 2004]. Als Beispiel haben Larrucea et al. nachgewiesen, dass sich die Wirkung der Ölsäure als Transportförderer für Tenoxicam verbessert, wenn gleichzeitig Propylenglycol in dem Vehikel anwesend ist [Larrucea et al. 2001]. Jedoch waren die Mischungen der zwei verwendeten Permeationsbeschleuniger Isopropylmyristat und Propylenglycol nicht wirksamer als einer dieser Permeationsenhancer

allein. Diese Kombination war nicht effektiv genug. Budhathoki and Thapa haben beobachtet, dass, wenn Isopropylmyristat und Propylenglycol gleichzeitig in der Zubereitung vorhanden sind, dann die höhere Konzentration an Isopropylmyristat zur einer kleineren Wirkstofffreisetzungsrates aus dem Vehikel führt [Budhathoki and Thapa 2005]. Daher wurde ein Maximum der Freisetzungsrates für Isopropylmyristatkonzentrationen zwischen 5 und 10% festgestellt. Während bei den vorliegenden Untersuchungen mit Mischungen von Isopropylmyristat und Propylenglycol keine synergistische Wirkung festgestellt werden konnte, haben Arellano et al. einen verstärkten Effekt dieser beiden Substanzen auf die Permeation von Diclofenac Natrium beobachtet [Arellano et al. 1998]. In ihrer Studie haben sie jedoch ein ganz anderes Konzentrationsverhältnis der beiden Transportbeschleuniger eingesetzt. Die maximale Transporterhöhung konnten sie bei 40% Propylenglycol und 3% Isopropylmyristat im Vehikel zeigen.

Aus den Ergebnissen der Permeationsuntersuchung mit der Isopropylmyristat-Propylenglycol-Kombination geht hervor, dass diese Mischung keinen synergistischen Effekt auf den Transport der Modellsubstanzen hat.

Schlussfolgerung

Liu et al. untersuchten den Einfluss von acht Absorptionsbeschleunigern, darunter Propylenglycol und Isopropylmyristat, auf die Permeation und Penetration von Cyclosporin A [Liu et al. 2006]. Die Ergebnisse belegen, dass die unterschiedlichen Vehikel die in vitro Penetration, nicht jedoch die Permeationsrate des Wirkstoffs beeinflussten. Um den Mechanismus der Wirkung von den hier untersuchten Transportbeschleunigern besser verstehen zu können, wird vorgeschlagen, dass man neben der Permeation ebenfalls die Penetrationsprofile der Substanzen aus den Formulierungen bestimmt.

In Bezug auf die rheologischen Eigenschaften des Vehikels, sollte sich theoretisch eine niedrigere Permeationsrate aus den Grundlagen mit höherer Viskosität zeigen. Es besteht aber keine Korrelation zwischen der plastischen Makroviskosität der modifizierten Grundlagen und dem beobachteten Wirkstoffmassentransport über die Haut. Somit kann behauptet werden, dass die Diffusion in der Grundlage und die Freisetzung aus der Zubereitung nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Transportprozess über die Haut bilden. Allerdings soll hier noch kurz auf die Mikroviskosität des Vehikels eingegangen werden. Bekanntermaßen spielt bei den Hydrogelen ihre Mikroviskosität und nicht ihre Makroviskosität eine bedeutende Rolle für die Freisetzung des Wirkstoffs [Wellin-Berger et

al. 2001]. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte jedoch nur die Makroviskosität des Vehikels verfolgt werden.

Die Auswahl eines geeigneten Transportbeschleunigers in der präklinischen Entwicklungsphase gestaltete sich auf Grund der substanzspezifischen und konzentrationsabhängigen Wirkung dieser chemischen Verbindungen schwierig. Eine erste Auswahl kann auf der Basis von Literaturdaten erfolgen. Im nächsten Schritt muss die Kompatibilität des Wirkstoffs mit den ausgewählten Penetrationsbeschleunigern untersucht werden. Daraus resultiert eine begrenzte Gruppe von Transportbeschleunigern, die mittels in vitro Permeationsuntersuchung mit einer begrenzten Anzahl von Probeentnahmezeitpunkten schnell auf die dermale Transportrate geprüft werden kann. Neue Möglichkeiten auf diesem Gebiet eröffnen die Untersuchungen von Karande et al. [Karande et al. 2004]. Karande et al. haben ein miniaturisiertes Screeningsverfahren beschrieben, das auf der Messung der elektrischen Impedanz der Haut basiert, die zwischen zwei Platten mit 100 Wells gespannt ist. Jede Kammer auf dieser Platte hat einen Durchmesser von 3 mm und kann mit 75 μ L einer Formulierung gefüllt werden. Mittels dieser Methode sind sie somit im Stande bis 1000 Experimente am Tag durchzuführen und die besten synergistischen Mischungen von Transportbeschleunigern auszusuchen. Auf diese Weise wurden z.B. zwei Enhancermischungen ausgewählt, die eine 100fache Fluxerhöhung einer makromolekularen Substanz, wie Heparin, ermöglichen.

8. Abschließende Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein neuartiges Ablaufschema zur besseren Selektion von Substanzen und Grundlagen für halbfeste Zubereitungen sowie deren schnellere präklinische Entwicklung. Dabei werden unterschiedliche Methoden auf ihre Aussagefähigkeit bei den einzelnen Entwicklungsschritten bewertet.

Halbfeste Formulierungen stellen komplexe Systeme dar, deren Komponenten nicht isoliert betrachtet werden können. Vielmehr müssen die zahlreichen möglichen Wechselbeziehungen der Einzelbestandteile untereinander sowie diejenigen mit dem Wirkungsort und mit der Haut, die auch den Transport beeinflusst [Voigt 1995], betrachtet werden. Das wissenschaftliche Ziel war die Erstellung einer Strategie zur Entwicklung halbfester Zubereitungen, die schnell sowie kostengünstig ist und mit kleinen Wirkstoff- und Formulierungsmengen auskommt.

Zuerst wurden experimentelle Untersuchungen anhand einer Substanzgruppe durchgeführt, um kritische Punkte zu erkennen und die optimale Auswahl der Methoden in den unterschiedlichen Etappen der Entwicklung zu treffen. Mit den ausgewählten Modellsubstanzen wurde ein möglichst breites Spektrum an physikochemischen Eigenschaften abgedeckt. Dabei wurden auch Substanzen aus einer chemischen Gruppe berücksichtigt, die bereits vermarktet wird. Die Substanzen wurden in eine Reihe von Grundlagen inkorporiert, die sich unter anderem in ihrem Wassergehalt unterschieden. Auf Basis der Ergebnisse aus den experimentellen Phasen I und II zur physikochemischen Charakterisierung der Modellsubstanzen und der Grundlagen, sowie der physikochemischen und biopharmazeutischen Charakterisierung der Formulierungen und deren Optimierung wird hier ein Ablaufschema für die schnellere präklinische Entwicklung der halbfesten Zubereitungen vorgeschlagen.

Das anhand der gewonnenen und analysierten Ergebnisse vorgeschlagene Ablaufschema besteht für die neuen Wirkstoffkandidaten aus sieben Elementen, die in Abb. 8.1 zusammengefasst sind.

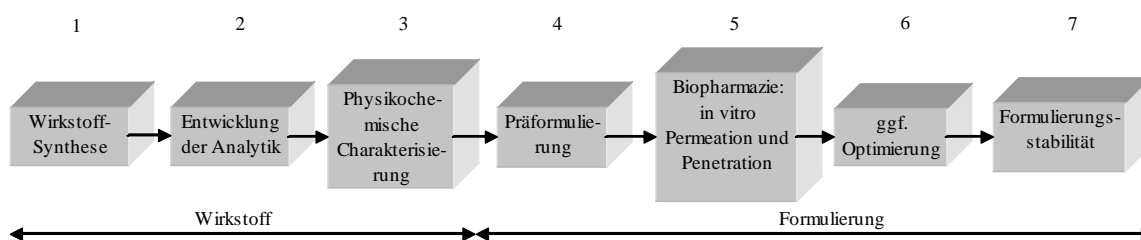


Abb. 8.1: Allgemeines Schema zur präklinischen Prüfung in der Entwicklung halbfester Zubereitungen

Um die Miniaturisierung und Zeitreduzierung des Verfahrens zu erreichen, müssen effektive und schnelle Methoden eingesetzt werden, wie z.B. die Bestimmung des Kapazitätsfaktors auf der IAM-Säule.

Auf Basis dieser Arbeit wird das Ablaufschema für die präklinische Entwicklung halbfester Darreichungsformen entsprechend Abb. 8.2 vorgeschlagen.

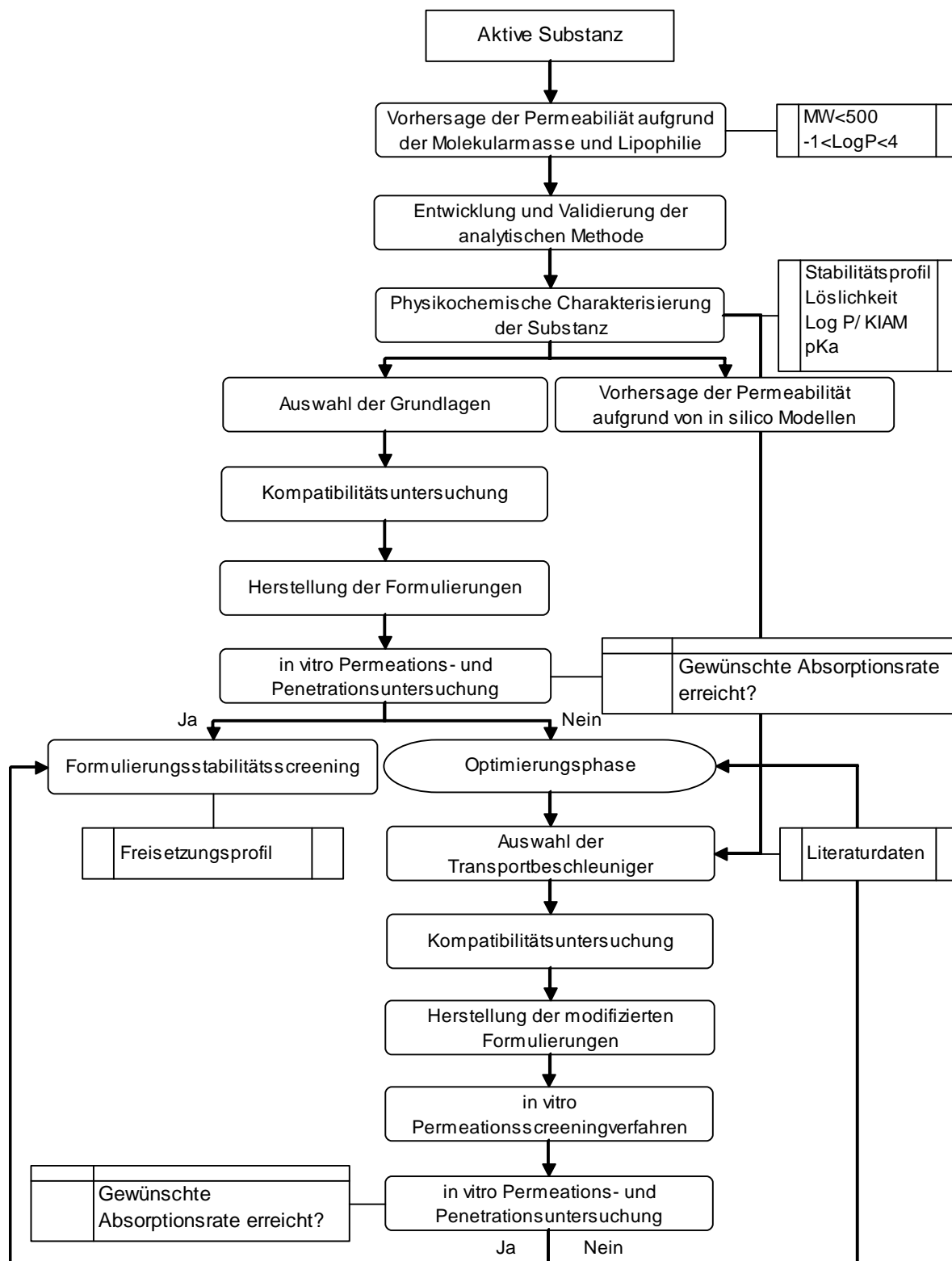


Abb. 8.2: Vorgeschlagenes Ablaufschema für die präklinische Entwicklung halbfester Zubereitungen

Die präklinische Phase beginnt für neue Entwicklungskandidaten mit der Wirkstoffsynthese. Danach können erste Aussagen über das dermale Permeationspotential auf Grund der Molmasse und des mittels mathematischer Algorithmen berechneten Log P-Werts getroffen werden. Vor dem Beginn der weiteren experimentellen Arbeit muss eine analytische Methode zur quantitativen Bestimmung des Wirkstoffgehaltes entwickelt und teilvalidiert werden. Anschließend erfolgt die physikochemische Charakterisierung der aktiven Substanz unter Berücksichtigung der Faktoren, die den Hauttransport und die Präformulierung beeinflussen (siehe Abb. 8.3). Hier können vor allem die Nephelometrie und die Verteilung auf der IAM-Säule auf Grund der einfachen und schnellen Datengewinnung, sowie dem sehr kleinen Substanzverbrauch eingesetzt werden. Zu den wichtigsten Eigenschaften des Wirkstoffs, die bei der Formulierung zu beachten sind, gehören: pKa-Wert, Stabilität, Verteilungskoeffizient (Log P oder K_{IAM}) und Löslichkeit. Löslichkeit und Lipophilie eines Wirkstoffs bilden zwei Basisparameter in der präklinischen Entwicklung halbfester Zubereitungen. Die Löslichkeitsangaben werden unter anderem zur Durchführung der Permeationsexperimente und der Verteilungskoeffizient zur Vorhersage der Hautpermeabilität benötigt. Die Permeabilität des Wirkstoffs ist eine komplexe Funktion unterschiedlicher Wirkstoffparameter, wie Ionisierungsgrad, Lipophilie, Molmasse, sowie der Vehikel- und Hauteigenschaften. Bei den eigenen Untersuchungen konnte keine direkte, einfache Abhängigkeit der Wirkstoffpermeabilität von den meisten physikochemischen Eigenschaften festgestellt werden. Nur zwischen der Permeabilität und der Molmasse der untersuchten Wirkstoffe wurde eine gewisse Korrelation gefunden. Das stimmt mit den Beobachtungen von Magnusson et al. an ähnlichen Systemen gut überein [Magnusson et al. 2004]. Auf eine direkte Bestimmung der Proteinbindung eines Entwicklungskandidaten wird im vorgeschlagenen Ablaufschema verzichtet, obwohl diese wichtige Informationen über die Neigung des Wirkstoffs zur Depotbildung in den Hautschichten liefern könnte [WHO 2006], denn in der Literatur wird darauf verwiesen, dass eine gute Korrelation zwischen der Proteinbindung einer Substanz und ihrem Log P-Wert (bzw. K_{IAM} -Wert) besteht [Valko et al. 2003]. Anhand dieser Korrelation kann man diesen Parameter approximieren. Andererseits konnte aus den experimentellen Ergebnissen kein direkter Zusammenhang zwischen der Proteinbindung und dem Transport über die Haut hergestellt werden. Aus ähnlichen Gründen wurde auf die Bestimmung der Schmelzpunkte verzichtet. Der Schmelzpunkt eines Wirkstoffs ist ein Surrogat-Parameter und korreliert mit seiner Löslichkeit und seinem Log P-Wert [Bannerjee et al. 1980]. Ähnlich wie bei der Proteinbindung wurde keine gute Korrelation

zwischen diesem Parameter und dem Transport der Modellsubstanzen über die Haut beobachtet.

Nach der Bestimmung der physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs kann eine etwas genauere Vorhersage seiner Permeabilität mit in silico Modellen stattfinden. Informationen über die intrinsische Stabilität der Substanz sind notwendig, um entsprechende Maßnahmen bei der Formulierung und Lagerung berücksichtigen zu können. Die Kenntnis der Zersetzungsprofile und -mechanismen ist auch für die Entwicklung der analytischen Methoden sehr hilfreich. Die intrinsische Stabilität des Wirkstoffs in Suspension und in Lösung wird unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht: sehr starke saure und basische Umgebung sowie typische Bedingungen, die in der Formulierung auftreten werden.

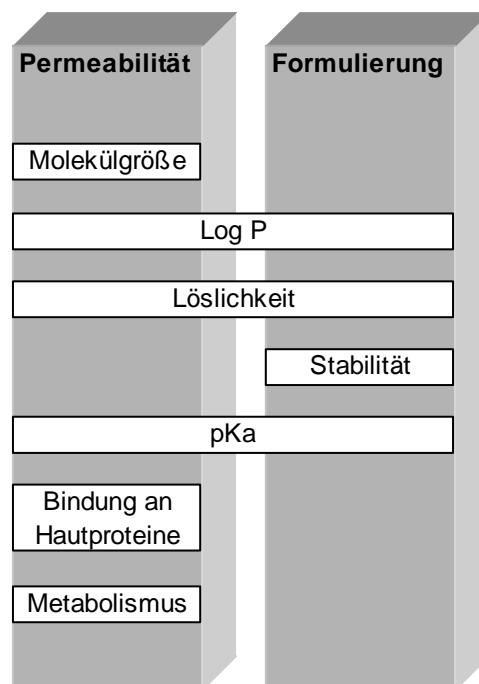


Abb. 8.3: Die wichtigsten Wirkstofffaktoren in Bezug auf Permeabilität und Formulierung

Entscheidend für die Wirksamkeit einer halbfesten Formulierung ist neben der Wirkstoffpotenz auch das richtige Vehikel. Da Wirkstoffkandidaten unterschiedliche chemische Strukturen aufweisen und daraus folgend unterschiedliche galenische Eigenschaften besitzen, kommt der galenischen Entwicklung eine besondere Bedeutung zu. Die Auswahl einer geeigneten Grundlage für den Wirkstoffkandidat steht somit im Zentrum der präklinischen Prüfung bei der Entwicklung der halbfesten Zubereitungen. Bei der Auswahl der Grundlage müssen sowohl die vorher genannten physikochemischen Eigenschaften der aktiven Substanz, als auch die Kompatibilität der Hilfsstoffe mit dem Wirkstoff und die Hautfaktoren, wie Hauttyp, Hautzustand und Applikationsort,

berücksichtigt werden. Allgemeingültige Aussagen zur Auswahl einer geeigneten Grundlage sind auf Grund des komplizierten Aufbaus der meisten pharmazeutischen Darreichungsformen nicht möglich und müssen im Rahmen der Entwicklung erbracht werden. Auf der Basis der experimentellen Ergebnisse wurde festgestellt, dass der Transport einer lipophilen Substanz aus einem hydrophilen Vehikel bevorzugt wird. Das stimmt mit Literaturangaben anderer Systeme gut überein [Lieken 2003, Csoka et al. 2005, Wagner 2001]. Im Gegensatz dazu sollen lipophile Grundlagen für hydrophile Wirkstoffe ausgewählt werden, um einen höheren Wirkstoffverteilungskoeffizienten zwischen Haut und Vehikel zu erreichen. Amphiphile Grundlagen als Basiscremes erwiesen sich in Bezug auf den Substanztransport über die Haut als deutlich weniger effizient als lipophile oder hydrophile Zubereitungen. Zur Grundlagencharakterisierung wurde hier der pH-Wert der Zubereitungen bestimmt, um sicher zu sein, dass die Wirkstoffstabilität in der Grundlage gewährleistet wird. Die Betrachtung der rheologischen Eigenschaften der Systeme führte zu folgendem Resümee: die Viskosität einer halbfesten Formulierung spielt eine große Rolle bei der Diffusion des Wirkstoffs in der Grundlage und bei dessen Freisetzung aus der Grundlage, beeinflusst jedoch nur in geringem Umfang den Transport über die Haut, solange die Liberation nicht der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist. Die Bestimmung und Beobachtung dieser physikalischen Eigenschaft kann wichtige Informationen über eintretende Veränderungen in der Formulierung während der Stabilitätsuntersuchung liefern [Rose 1999]. In dem vorgeschlagenen Ablaufschema wurde jedoch auf diese Bestimmung verzichtet wegen des geringeren Einflusses auf den Wirkstofftransport über die Haut [Welin-Berger et al. 2001].

Wenn die vorgesehenen Hilfsstoffe mit dem Wirkstoff kompatibel sind, kann im nächsten Schritt die Herstellung der ersten Formulierungen erfolgen. Zunächst sollten die Formulierungen auf die *in vitro* Permeation und/oder Penetration untersucht werden. Die ideale Membran in Bezug auf die spätere Vergleichbarkeit mit der *in vivo* Situation ist die exzidierte Humanhaut [OECD 2004 und 2004b, Schäfer-Korting et al. 2006]. Die Hautpermeabilitäten der üblichen Labortiere sind deutlich höher als die der menschlichen Haut [Magnusson et al. 2001]. Die Auswahl einer Humanhautmembran, wie z.B. Vollhaut oder hitzeseparierte Epidermis, muss auf Grund der Zielsetzung der Untersuchung getroffen werden. Aber auch der Einsatz rekonstruierter Hautmodelle ist möglich, wie die durchgeführten Untersuchungen belegen. Allerdings sollte die Vergleichbarkeit der Resultate mit denen einer Testung an Humanhaut belegt werden. Dieser Ansatz bietet viele Vorteile, wie kürzere Zeit zur Datengewinnung, kleinere Variabilität im Vergleich zur exzidierten Humanhaut und bessere Zugänglichkeit [Schäfer-Korting et al. 2006 und 2007]. Auf Grund

der interindividuellen Humanhautvariabilität sollen die in vitro Versuche mindestens an zwei Häuten unterschiedlicher Spender untersucht werden. Um die Variabilität der Haut beim Vergleich der in vitro Permeabilitäten zu berücksichtigen, ist eine Standardisierung des in vitro Permeationsverfahrens erforderlich. Die Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) bei den in vitro Absorptionsuntersuchungen wurde als ungeeignet zur Abschätzung der Hautintegrität erkannt [Netzlaff et al. 2006 b]. Alternativ soll die Permeabilität einer zusätzlichen Substanz, z.B. Koffein aus einer Lösung, an der getesteten Haut untersucht werden, um darüber die Ergebnisse korrelieren und vergleichen zu können [OECD 2004 und 2004b]. Die Ergebnisse dieser Messungen sollen im Idealfall in einer Datenbank gespeichert werden.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Wirkstoff-Liberation aus den vorliegenden halbfesten Formulierungen in der Regel nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei dem Diffusionsprozess über die Haut ist. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen ähnlicher Systeme [Malzfeldt et al. 1989, Dias et al. 1999]. Deswegen wird die in vitro Untersuchung der Freisetzung aus halbfesten Zubereitungen für die reine Formulierungscharakterisierung bei der präklinischen Entwicklung von halbfesten Formulierungen nicht als obligatorisch angesehen und erscheint zunächst nicht im Ablaufschema zur Charakterisierung der Formulierung. Es ist sinnvoller, diese Methode als ersten Schritt bei der Beurteilung der Formulierungsstabilität einzusetzen, da dieses Verfahren Hinweise auf komplexe Veränderungen in der Zubereitung geben kann. Freisetzungsuntersuchungen werden zur Zeit bei der Zulassung neuer in kleinem Ausmaß veränderter halbfester Zubereitungen angesetzt, das beschreibt die SUPAC-SS Guideline [Guidance for Industry SUPAC-SS 1998, Guidance for Industry SUPAC-SS 1997, Dias et al. 1999]. Die Liberationsuntersuchungen können recht gut zur Abschätzung der maximalen Absorptionsrate dienen.

Wenn eine Optimierung der Wirkstofftransportrate bei der Entwicklung neuer halbfester Darreichungsformen notwendig ist, werden Transportbeschleuniger sehr häufig diskutiert [Daniels 2004, Barry 2001, Foldvari 2000, Walker und Smith 1996]. Aus den eigenen durchgeführten Experimenten resultiert, dass die Transportverbesserer substanzspezifisch und konzentrationsabhängig wirken können. Dabei kann deren Konzentration nicht grenzenlos gesteigert werden, da sie die Haut irritieren können. Für die in dieser Arbeit untersuchten penetrationsfördernden Substanzen wurden unterschiedliche Effekte auf den Transport der drei Modellsubstanzen in Abhängigkeit von der Chemie des eingesetzten Enhancers und seiner Konzentration in der Zubereitung beobachtet. Diese im allgemeinen als

Transportverbesserer angesehenen Substanzen haben in den Versuchen in einigen Fällen Permeationserhöhung (z.B. Isopropylmyristat für Koffein), in anderen auch Permeationshemmung (z.B. Saccharosestearat für Testosteron und Hydrocortison) verursacht. Mehrfach wurde weder ein positiver noch ein negativer Einfluss auf die Permeationsrate beobachtet. Als Gesamtbild aus den dazu unternommenen Untersuchungen ergibt sich, dass die Auswahl eines geeigneten Absorptionsbeschleunigers spezifisch in Bezug auf einige wichtige Parameter erfolgen muss.

Der im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagene Ablauf in der Optimierungsphase der halbfesten Formulierungen basiert auf vier Hauptschritten: 1) auf der Suche nach einem Transportbeschleuniger soll zuerst eine Literaturrecherche durchgeführt werden, um die penetrationsfördernden Substanzen für Wirkstoffe mit vergleichbarer chemischer Struktur und ähnlichen physikochemischen Eigenschaften zu identifizieren. 2) Im nächsten Schritt soll der Einfluss der potentiellen Absorptionsbeschleuniger auf die Stabilität der aktiven Substanz anhand von Kompatibilitätstests untersucht werden. Auf dieser Basis kann eine engere Enhancerkandidatengruppe ausgewählt werden. 3) Die galenische Optimierung wird durch präklinische Versuche an Humanhaut *in vitro* begleitet. Mittels der folgenden *in vitro* Permeationsuntersuchungen mit reduzierten Probenzeitpunkten können geeignete Transportbeschleuniger schnell identifiziert werden. 4) Für die anhand dieses *in vitro* Screeningverfahrens ausgewählte engere Gruppe, d.h. für die optimalen Absorptionsverbesserer, sollten anschließende genauere *in vitro* Untersuchungen zur Permeation und Penetration unternommen werden.

Der letzte Abschnitt des vorgeschlagenen Ablaufschemas beinhaltet einen beschleunigten Haltbarkeitstest. Zur Untersuchung der Formulierungsstabilität wird ein Schaukeltest mit einem Prüfzeitpunkt nach zwei Wochen eingesetzt. Als Prüfpunkt wird die Freisetzungsrates vor und nach der Belastung kontrolliert. Falls für die Formulierung Änderungen im Freisetzungsprofil auftreten, müssen genauere Untersuchungen dazu unternommen werden.

Am Ende des vorgeschlagenen Verfahrens sollte das Produkt stehen, welches den am Anfang definierten Akzeptanzkriterien entspricht. Anschließend können Langzeitstabilitätsstudien durchgeführt werden und die Formulierung kann in die klinische Phase der Entwicklung übergehen.

Die vier Elemente aus dem in der Abb. 8.1 dargestellten allgemeinen Schema zur Entwicklung halbfester Zubereitungen sind in Abb. 8.4 detaillierter betrachtet.

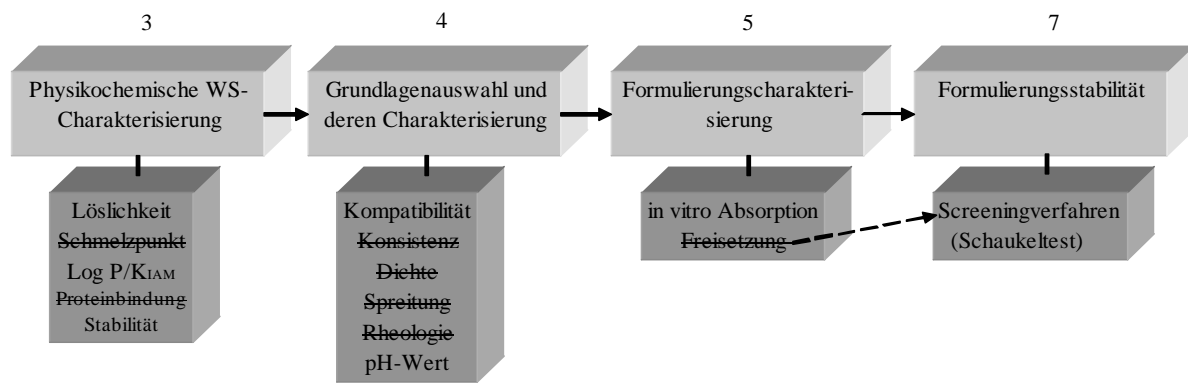


Abb. 8.4: Detaillierte Darstellung der vier Elemente aus der Abb. 8.1

Von Vorteil ist, dass anhand dieses Verfahrens die besten Wirkstoffkandidaten und die optimalen Formulierungen schnell identifiziert werden können. Das vorgeschlagene Ablaufschema erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit aller Aspekte der präklinischen Entwicklung der halbfesten Formulierungen. Im vorgeschlagenen Verfahren wurde eine Reduzierung auf die Parameter vorgenommen, die eine kritische Rolle bei der Formulierung der halbfesten Zubereitungen und beim Hauttransport spielen. Eine Schwierigkeit bei Erstellung eines solchen allgemeinen Ablaufschemas ist ein stark variierendes Anforderungsprofil, das an die halbfesten Formulierungen gestellt werden kann (z.B. der Wirkstoff soll nur lokal oder systemisch wirken). In einem solchen Fall müssen unter Umständen weitere Schwerpunkte identifiziert werden.

In Tab. 8.1 und in Abb. 8.5 sind die Zeiten der einzelnen Phasen bzw. Bestimmungen sowie Substanz- und Formulierungsverbrauch (auf eine Grundlage bezogen) der während dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen dargestellt. Der Substanzverbrauch hängt selbstverständlich von der Anzahl der untersuchten Grundlagen ab. In Bezug auf die Länge der Entwicklungsphase können einige dieser Bestimmungen, z.B. die zur physikochemischen Charakterisierung der Substanz, parallel durchgeführt werden, um Zeit zu sparen.

Tab. 8.1: Zeit, sowie Substanz- und Formulierungsverbrauch während des Verfahrens

Phasen/Bestimmungen während der präklinischen Entwicklung der halbfesten Formulierungen		Zeit [Tage]	Substanzverbrauch [mg]	Formulierungsverbrauch [g]
Vorhersage der Permeabilität anhand der Molekularmasse und der Lipophilie der Substanz (1)	Log P rechnerisch	0,5	-	-
Entwicklung und Teilvalidierung der analytischen Methode		2	10	-
Physikochemische Charakterisierung des neuen Kandidaten	Gesamt	8,5-11,5	19-23	-
	Stabilitätsprofil	7	14	-
	Löslichkeitsbestimmung:	0,5-2	1-2	-
	○ über Nephelometrie	0,5	2	-
	○ Sättigungslöslichkeit	2	1	-
	Verteilungskoeffizient:	0,5-2	1-4	-
	○ Log P rechnerisch	0,5	-	-
	○ Log P experimentell	2	4	-
	○ K _{IAM} -Wert	1	1	-
	pKa-Wert	0,5	3	-
Vorhersage der Permeabilität mit den in silico Modellen (2)		1	-	-
Auswahl der Grundlagen aufgrund der bestimmten WS-Eigenschaften		1	-	-
Kompatibilitätsuntersuchung mit den Hilfsstoffen aus den ausgewählten Grundlagen (10 Wirkstoff/Hilfsstoff-Mischungen)		4-5*	10**	-
Herstellung der Formulierungen		2	10***	(10)
in vitro Permeations- und Penetrationsuntersuchung		6	1,2	1,2
Formulierungsstabilitätsscreening		4*	3,6	3,6
ggf. Optimierungsphase	Gesamt	18-19	21,8	1,8
	Suche nach Enhancerkandidaten anhand der Literaturdaten	3	-	-
	Kompatibilitätsuntersuchung (10 Wirkstoff/Hilfsstoff-Mischungen)	4-5*	10**	-
	Herstellung der modifizierten Formulierungen	2	10	(10)
	in vitro Permeation-screeningverfahren	3	0,6	0,6
	in vitro Permeations- und Penetrationsuntersuchung	6	1,2	1,2
Insgesamt		47-52	75,6-79,6	4,8

* reine Arbeitszeit (ohne Lagerzeit)

** 1 mg pro untersuchter Hilfsstoff oder pro Enhancer

** pro 10 g der Grundlage bei der Konzentration von 0,1%

() Herstellung

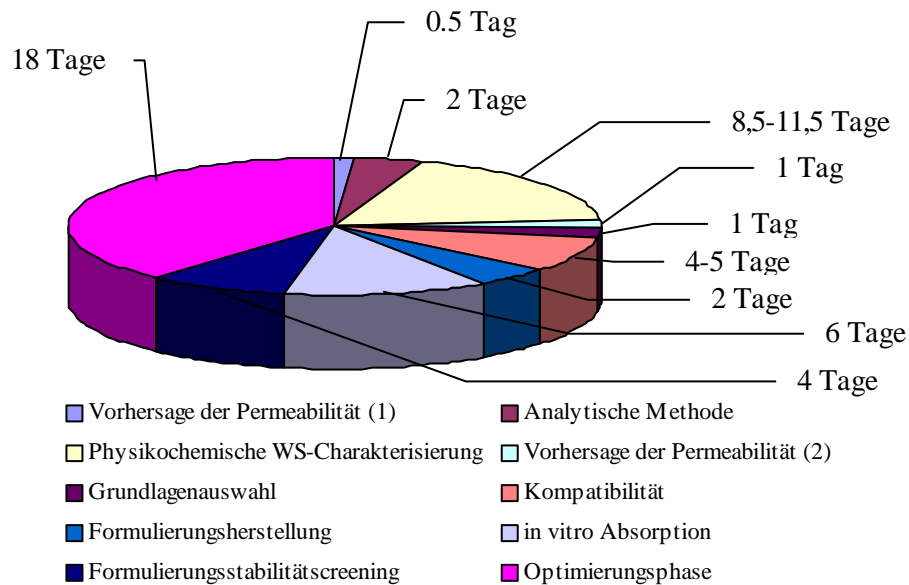


Abb. 8.5: Zeitverbrauch im vorgeschlagenen Ablaufschema

Der im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagene Prozess zur präklinischen Entwicklung halbfester Zubereitungen kann innerhalb von zwei bis drei Monaten realisiert werden. Die Lagerzeiten (Formulierungsstabilitätscreening + Kompatibilitätsuntersuchung) summieren sich auf 70 Tage. Der wesentliche Vorteil ist also an erster Stelle die erreichte Zeitreduktion in der präklinischen Phase. Ein weiterer großer Vorteil ist der geringe Substanz- und Formulierungsverbrauch. Ähnlich wie dies bei oralen Darreichungsformen angestrebt wird [Balbach und Korn 2004], war hier der Substanzenverbrauch unter 100 mg. Die Formulierungsmenge sollte auf Grund des damit verbundenen Substanzverbrauchs möglichst klein sein. Der abgeschätzte Formulierungsbedarf liegt unter 10 g. Es ist nicht notwendig, größere Formulierungsmengen herzustellen, soweit eine Herstellung der Formulierung im Mikromaßstab möglich ist.

Resümierend lässt sich sagen, dass dieses Verfahren eine schnelle und ökonomische Identifizierung der besten Wirkstoffkandidaten für die transdermale Absorption und der besten halbfesten Formulierungen mit diesen Wirkstoffkandidaten ermöglicht. Anhand dieses Verfahrens kann man halbfeste Darreichungsformen entwickeln, die sicherstellen, dass der Wirkstoff den Wirkort in ausreichender Konzentration erreicht.

9. Zusammenfassung und Ausblick

9.1. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden schwerpunktmäßig zwei Aufgaben bearbeitet. Die erste Aufgabe bestand in der Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen halbfesten Formulierungen auf den Transport von Wirkstoffen mit variierenden physikochemischen Eigenschaften in vitro durch die Haut. Hintergrund dieser Prüfungen war eine nähere Bewertung des Methodenspektrums zur präklinischen Entwicklung halbfester Zubereitungen. Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es jedoch, aufbauend auf den ersten Teil ein optimiertes Ablauf- und Prüfverfahren für die erste Entwicklungsphase streichfähiger Produkte im pharmazeutischen und kosmetischen Bereich zu erstellen. Anhand dieses Schemas soll es möglich sein, optimierte Formulierungskandidaten schnell und kostengünstig sowie unter möglichst geringem Verbrauch des Wirkstoffkandidaten zu identifizieren.

Als Modellsubstanzen zur Prüfung dieser Fragestellungen wurden die vier Corticosteroide Hydrocortison, Mometasonfuroat, Clobetasolpropionat und Betamethasonvalerat, ausgesucht, die neben den zwei OECD Markern Koffein und Testosteron, eine für die pharmazeutische Anwendung repräsentative Substanzklasse darstellen. Auf Grund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften, wie Lipophilie und Molmasse, können sie auch als Modellsubstanzen für kosmetische Produktentwicklungen herangezogen werden. Darüber hinaus wird Koffein als so genannter kosmetischer Wirkstoff (Active Cosmetic Ingredient (ACI)) in jüngster Zeit in unterschiedliche kosmetische Produkte eingearbeitet. Die physikochemische Charakterisierung der Wirkstoffe umfasste solche Eigenschaften wie Löslichkeit, Schmelzpunkt, Lipophilie, Proteinbindung. Ausgehend von der physikochemischen Charakterisierung wurde das Permeationsverhalten der Testsubstanzen mittels zwei in silico Modellen, anhand der Gleichung von Potts & Guy und Wilschut et al. abgeschätzt [Potts und Guy 1992, Wilschut et al. 1995]. Das Stabilitätsprofil der Modellwirkstoffe wurde unter Berücksichtigung der Faktoren wie Hydrolyse, thermische Zersetzung und Oxidationsempfindlichkeit ermittelt.

In einem zweiten Schritt wurden die drei offizinellen Basisgrundlagen Basiscreme DAC, Wollwachsalkoholsalbe DAB und Carbomergel DAB ausgewählt. Die selektierten Grundlagen unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihren Wassergehalt. Zunächst wurde die Stabilität der Modellsubstanzen in Gegenwart der Bestandteile der ausgewählten halbfesten Zubereitungen geprüft. Bei der physikochemischen Charakterisierung der

Grundlagen wurden Konsistenz, Dichte, Spreitung, rheologische Eigenschaften und pH-Wert anhand der üblichen Methoden bestimmt.

Darauf aufbauend wurden die wirkstoffhaltigen Systeme getestet. Die Wirkstoffzubereitungen wurden in in vitro Permeationstudien an exzidiierter Humanhaut und an rekonstruierten Hautmodellen näher untersucht. Das Freisetzungsprofil der Wirkstoffe wurde aus jeder halbfesten Zubereitung bestimmt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden im Hinblick auf den Einfluss der verwendeten Grundlagen und der verwendeten Modellsubstanzen und deren physikochemischen Eigenschaften miteinander verglichen und diskutiert. Die Formulierungsstabilität wurde anhand eines beschleunigten Haltbarkeitstests untersucht. Die Zubereitungen wurden dabei auf makroskopische und mikroskopische Veränderungen, den Wirkstoffgehalt, den pH-Wert, die Freisetzungsrates und Änderungen der Konsistenz geprüft.

In der zweiten experimentellen Phase erfolgte eine Optimierung der halbfesten Systeme im Hinblick auf die Permeationsrate durch den Zusatz transportbeschleunigenden Hilfsstoffe. Auf Grund der höheren Transportrate für die Steroide im Vergleich zu Basiscreme und Wollwachsalkoholsalbe, wurde das Carbomergel als Basisgrundlage für die weiteren Untersuchungen in dieser Phase ausgewählt. Die Anzahl der Modellsubstanzen wurde auf drei (Hydrocortison, Testosteron und Koffein) reduziert. Zunächst wurden die Auswirkungen dreier Transportenhancer untersucht, die unterschiedliche Wirkungsmechanismen aufweisen. Propylenglycol, Isopropylmyristat und Saccharosestearat wurden jeweils einzeln in drei verschiedenen Konzentrationen in das Carbomergel unter gleichzeitiger Zugabe von HPMC eingearbeitet. Isopropylmyristat und Propylenglycol wurden auch als Mischungen geprüft, um nach synergistischen Effekten beim Wirkstofftransport durch die Haut zu suchen. Die Testsubstanzen wurden auf Kompatibilität der mit den neuen Hilfsstoffen aus der modifizierten Grundlage geprüft. Dabei zeigte sich, dass alle ausgewählten Hilfsstoffe mit den Wirkstoffen kompatibel waren. Der Einfluss der Transportenhancer auf den Wirkstofftransport wurde anhand von in vitro Permeationsexperimenten mit reduzierter Probenentnahme geprüft, um so schnell einen optimalen Enhancer identifizieren zu können. Die beste Wirkung in den ausgewählten Systemen hatte Isopropylmyristat. Die rheologische Charakterisierung und die Bestimmung der Sättigungslöslichkeit erfolgten für die Grundlagen aus der Phase II, um ihren Einfluss auf die biopharmazeutischen Eigenschaften der Formulierung zu bewerten.

Auf Basis der durchgeführten Untersuchungen wurde ein allgemeines Ablaufschema für die präklinische Entwicklungsphase halbfester Zubereitungen erstellt. Für das vorgeschlagene Verfahren wurden Methoden und Parameter nach zwei wichtigen Kriterien ausgewählt: Sie mussten einerseits relativ verlässliche Aussagen über den Wirkstofftransport aus der Zubereitung gemacht haben und andererseits kostengünstig sein und in kürzester Zeit mit minimierten Wirkstoffmengen und Formulierungsansätzen eine Identifikation der besten Formulierungskandidaten für die klinische Entwicklungsphase ermöglichen.

9.2. Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagene Ablaufschema für die präklinische Entwicklung halbfester Darreichungsformen ermöglicht einen hohen Durchsatz bei der Identifikation der besten Formulierungskandidaten. Durch seine allgemeine Form bildet dieses Verfahren ein universell einsetzbares Modell sowohl für lokal in den äußeren Hautschichten wirkende Substanzen als auch für systemische. Das Verfahren bedarf in Abhängigkeit von der Fragestellung lediglich einer Anpassung oder Erweiterung.

Eine Schwierigkeit in dieser Arbeit bestand darin, eine Korrelation zwischen den experimentell bestimmten physikochemischen Wirkstoff- und Grundlagenparametern und dem Transport über die Haut zu finden. In einer Fortsetzung der vorgelegten Arbeit sollte man die Gruppe der Modellsubstanzen um zusätzliche Wirkstoffe erweitern, um den Einfluss dieser Parameter auf den Wirkstofftransport durch die Haut genauer untersuchen zu können, was jedoch im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Die Untersuchungen zum Einfluss permeationsfördernder Hilfsstoffe auf den Wirkstofftransport erfolgten in der Optimierungsphase am Beispiel eines Grundagentypus, eines hydrophilen Carbomergels. Es wäre interessant zu prüfen, ob durch Einarbeitung der Penetrationenhancer in die beiden anderen untersuchten Grundlagen (Wollwachsalkoholsalbe und Basiscreme) etwa gleich gute Permeationsraten zu erreichen sind oder ob es zu einer günstigen oder ungünstigen Wechselwirkung zwischen dem Enhancer und den Hilfsstoffen aus den Zubereitungen kommt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Wirkstoffdiffusion über die Haut in vitro Permeationsversuche unternommen. Als Ergänzung dazu bieten sich diejenigen in vitro Penetrationsuntersuchungen an, in denen das Eindringen einer Substanz in verschiedene Hautschichten verfolgt wird. Die Penetrationsprofile ermöglichen die

Beobachtung des Transports der Corticosteroide der neuesten Generation (Mometasonfuroat, Clobetasolpropionat und Betamethasonvalerat) in der Haut. Anhand der durchgeführten Permeationsexperimenten konnte man in diesem Fall nur feststellen, dass kein Wirkstoff in den Akzeptor diffundiert ist. Andererseits könnten detaillierte Penetrationsuntersuchungen zusätzlich Hinweise auf die Wirkung der permeationsfördernden Hilfsstoffe auf den Wirkstofftransport in der Haut geben.

Eine bedeutende Rolle innerhalb des Permeationvorgangs durch die Haut spielt die Wirkstofflöslichkeit und der Wirkstoffzustand (gelöst oder suspendiert) in der Formulierung [Malzfeldt et al. 1989]. Die Sättigungskonzentration bzw. die veränderte Sättigungskonzentration einer Substanz in der Formulierung ist darüber hinaus ein wichtiger Parameter in Bezug auf die Wirkung der transportfördernden Hilfsstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, mit welcher Methode die Sättigungskonzentration des Wirkstoffs in der Formulierung bestimmt werden kann. In der Literatur wird die Methode der mikroskopischen Ermittlungen häufig zitiert [Mitriakina und Müller-Goymann 2006, Brinkmann 2006]. Dabei wird die geringste Arzneistoffkonzentration mit nachweisbaren Kristallen in der Formulierung als Sättigungskonzentration deklariert [Loth et al. 1979]. Dieses Verfahren ist jedoch sehr zeitaufwändig und durch eine relativ hohe Ungenauigkeit gekennzeichnet, die von der ausführenden Person abhängig ist. In den eigenen Untersuchungen während der ersten Arbeitsphase wurden DSC-Messungen zur Bestimmung des Wirkstoffzustands in der Zubereitung durchgeführt. Diese Methode erwies sich auf Grund der geringen Konzentration an aktiver Substanz in der Formulierung als ungeeignet. In der zweiten Arbeitsphase (Optimierungsphase) konnte die Wirkstofflöslichkeit in den auf dem hydrophilen Carbomergel basierenden Formulierungen durch die Wirkstoffsättigungslöslichkeit in seiner wässrigen Phase angenähert werden. Die Anwendung dieser Methode erscheint jedoch problematisch für lipophile, meist mehrphasige Grundlagen. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen bleibt zu klären, anhand welcher Methoden die Bestimmung der Wirkstoffsättigungskonzentration in einer halbfesten Zubereitung schnell und effizient erfolgen kann und welche weiteren Methoden in dem vorgeschlagenen Ablaufschema zur Entwicklung halbfester Darreichungsformen berücksichtigt werden sollten.

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Entwicklung halbfester Formulierungen ist die Wirkstoffsättigungskonzentration im Stratum corneum nach der Formulierungsapplikation, darauf ist diese Arbeit im Rahmen des theoretischen Kapitels bereits eingegangen. Es wäre

hierbei interessant, das Zusammenspiel der Wirkstoffsättigungslöslichkeit in Vehikel und Haut zu untersuchen. Diese Untersuchung könnte konkrete Erklärungen bezüglich der Wirkmechanismen der transportfördernden Hilfsstoffe liefern und die hier gestellten Hypothesen bezüglich ihrer Wirkung bestätigen.

Diese Arbeit stellt ein effizientes Verfahren zur Selektion von Wirkstoffen und Grundlagen für halbfeste Formulierungen zur dermalen und transdermalen Applikation vor. Darauf aufbauend erkennt man zahlreiche weiterführende Aufgaben, deren Lösung zu einer Optimierung des Verfahrens für verschiedene Problemstellungen führen kann.

10. Methoden/Experimenteller Teil

10.1. Analytische Methode

10.1.1. HPLC

Für die Bestimmung der Testsubstanzen wurde eine analytische HPLC-Methode mit UV-Detektion entwickelt und validiert. Folgende Validierungsparameter wurden verwendet: Durchführung einer Systemeignung, Linearität, Präzision, Richtigkeit und Spezifität (Selektivität), Robustheit (Stabilität der Lösungen und Verdünnungseffekte). Die Messungen wurden an der Trennsäule Symmetry300 C₁₈ durchgeführt. Da die Proben aus Hautstudien nicht lösliche Gewebebestandteile enthalten können, wurde eine austauschbare Vorsäule verwendet.

Tab. 10.1: Zusammenfassung der analytischen Parameter

Analytische Parameter	
Analytisches Gerät	Waters Alliance 2695, 2996 PDA
Trennsäule	Symmetry300 C ₁₈ , 3,5 µm 100 mm x 4,6 mm (Länge, ID) Hersteller: Waters, Eschborn, Germany
Vorsäule	Symmetry300 C ₁₈ , 5 µm 20 mm x 3,9 mm (Länge, ID) Hersteller: Waters, Eschborn, Germany
Mobile Phase	A: 10 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 3,5 B: ACN
Chromatographischer Modus	Gradienten (Profil von der Testsubstanz abhängig), siehe Tab. 10.2-10.5
Fluss	1,0 mL min ⁻¹
Temperatur	40 °C (Säule), 20 °C (Autosampler)
Injektionsvolumen	20 µL
Wellenlängen/Messbereich	210 bis 450 nm
Analysenzyklus	12,0 min

Tab. 10.2: Gradienten und Auswertewellenlängen

Substanzname	Auswertewellenlänge [nm]	Gradient Nr.
Betamethasonvalerat	240	1
Clobetasolpropionat	239	1
Hydrocortison	245	3
Mometasonfuorat	249	1
Testosteron	245	1
Koffein	273	2

Tab. 10.3: Gradient 1

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,00	1,0	60,0	40,0
1,00	1,0	60,0	40,0
3,00	1,0	45,0	55,0
4,00	1,0	30,0	70,0
9,00	1,0	30,0	70,0
9,10	1,0	60,0	40,0
12,00	1,0	60,0	40,0

Tab. 10.4: Gradient 2

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,00	1,0	90,0	10,0
2,50	1,0	90,0	10,0
5,00	1,0	30,0	70,0
9,00	1,0	30,0	70,0
9,10	1,0	90,0	10,0
12,00	1,0	90,0	10,0

Tab. 10.5: Gradient 3

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,00	1,0	80,0	20,0
0,50	1,0	80,0	20,0
4,00	1,0	55,0	45,0
5,00	1,0	30,0	70,0
9,00	1,0	30,0	70,0
9,10	1,0	80,0	20,0
12,00	1,0	80,0	20,0

10.1.2. LSC

Die aus den in vitro Untersuchungen entnommenen Proben von 300 μL wurden direkt ohne weitere Verdünnung in die 24 well Szintillationsplatte pipettiert, mit 0,5 mL Szintillationscocktail versetzt und bei Raumtemperatur über eine Stunde bei 200 U/min gemischt. Anschließend wurden die Proben im Beta-Counter vermessen (counting time 5 Minuten).

Szintillationszähler: Wallac, Microbeta (Perkin Elmer, Wellesly, MA, USA)

Szintillationsplatten: 24 well Polypropylenplatten (Perkin Elmer, Wellesly, MA, USA)

Szintillationscocktail: Optiphase Supermix® (Perkin Elmer)

10.2. Löslichkeitsbestimmung

10.2.1. Nephelometrische Löslichkeit

Die Messungen wurden in 96-Well Mikrotiterplatten im NepheloStar Galaxy, einem Nephelometer der Firma BMG Labtech durchgeführt [Bevan und Loyd 2000, Kerns 2001]. Dabei wurden die Messungen in PBS-Puffer (pH 7,4) bei einer konstanten DMSO-Konzentration von 1% bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die untersuchten Wirkstoffe wurden in reinem DMSO gelöst. Für die Standardmessungen wurden Stocklösungen in einer Konzentration von 20 mg/mL angesetzt. Auf diese Weise konnte ein Umschlag von löslich zu unlöslich bei praktisch unlöslichen und einem Teil der sehr schwer löslichen Wirkstoffen gemessen werden. Für Koffein und Hydrocortison wurden zusätzliche Stocklösungen mit höherem Wirkstoffanteil hergestellt. Die Wirkstoffe wurden direkt in ein Eppendorf Cup eingewogen und mit 100 μL DMSO aufgefüllt. Die Lösungen wurden 2-3 Minuten stehen gelassen und dann auf einem Minishaker geschüttelt. Bei Bedarf erfolgte eine Behandlung im Ultraschallbad, bis eine homogene Suspension erhalten wurde.

Es wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte pro Substanz verwendet. Die Prüfung erfolgt für jede Konzentration in achtfacher Bestimmung. In die zwölfte Spalte der Platte wurden 297 μL PBS-Puffer (pH 7,4) und 3 μL der in DMSO gelösten Substanz pipettiert. In die übrigen Spalten kamen je 200 μL PBS / 1% DMSO. Dann wurden von der zwölften Spalte 100 μL in die elfte überführt, von dort wieder 100 μL in die zehnte Spalte usw. Vor jedem Pipetierschritt, wurde dabei durch mehrmaliges Aufziehen gemischt. Die 100 μL aus der dritten Spalte wurden verworfen. Spalte 1 und 2 waren Blankwerte.

10.2.2. Sättigungslöslichkeit

Zur Bestimmung der Sättigungslöslichkeit wurden ausgehend von den nephelometrischen Daten Konzentrationen über der Sättigung ausgewählt. Die Substanz wurde der jeweiligen vorgewärmten Lösung im Überschuss zugegeben und bei 32 °C für 24 Stunden überkopf geschüttelt. Die ungelöste Substanz wurde durch Filtration mittels auf die gleiche Temperatur vorgewärmter Spritzenfilter (Millex-HV, Millipore, 0,45 µm) abgetrennt. Aus dem Filtrat wurden 3 Replikate aufgearbeitet. Gegebenfalls wurde das Filtrat mit dem jeweiligen Analytikpuffer verdünnt und anhand der in Kapitel 10.1.1 beschriebenen analytischen Methode analysiert. Die Auswertung erfolgt über eine Einpunktkalibrierung, da die Linearität und Richtigkeit in dem Arbeitsbereich bereits demonstriert wurde.

10.3. Schmelzpunkte

Für thermoanalytische Untersuchungen wurde ein Differential Scanning Calorimeter DSC 820 der Firma Mettler-Toledo genutzt. Die Proben wurden in Aluminiumtiegel kaltverschweißt und gegen luftgefüllte Referenztiegel vermessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Indium und Zinn. Schmelzpunkte wurden mit der computergesteuerten Software ermittelt.

Tab. 10.6: Parameter für die Schmelzpunktermittlung mittels DSC

DSC-Parameter	
Heizrate	10 K/min
Spülgas	N ₂
Spülgasstrom	200 mL/min
Probenbehälter	Aluminiumstandard
Probeneinwaage	ca. 1 mg

10.4. Indikatoren für die Membranpermeabilität

10.4.1. Verteilungskoeffizient Log P

Zur Bestimmung des Octanol/Puffer Verteilungskoeffizienten wurde die folgende Shake Flask Methode benutzt. Obwohl eine Abhängigkeit des Log P Wertes vom pH Wert nicht zu erwarten war, wurde als wässrige Phase KRB-Puffer pH 7,4 ausgewählt, da dieser auch als Akzeptormedium in Permeationsexperimenten dient. Als lipophile Phase diente Octanol.

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wurden die Literatur- und Löslichkeitsdaten berücksichtigt. Dabei ergaben sich folgende Einwaagen der Testsubstanzen und Volumina von Octanol und von KRB Puffer (Tab. 10.7).

Tab. 10.7: Versuchsbedingungen für die Log P-Wertbestimmung

Substanz	Einwaage [mg]	Octanolvolumen [mL]	KRB-Volumen [mL]
Betamethasonvalerat	4	1	10
Clobetasolpropionat	4	0,5	10
Hydrocortison	3	2	10
Mometasonfuorat	1	5	15
Testosteron	4	1	10
Koffein	1	5	5

Die Substanzen wurden in einem Glasgefäß eingewogen, mit dem entsprechenden Volumen an Octanol versetzt und mit Ultraschall behandelt. Der KRB Puffer pH 7,4 wurde hinzugefügt, die Probe kurz geschüttelt und erneut im Ultraschallbad behandelt. Der Ansatz wurde anschließend 3 h bei Raumtemperatur überkopf geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubation, wurden die Proben bis zur Phasentrennung bei Raumtemperatur gelagert und gegebenenfalls zentrifugiert, um diesen Vorgang zu beschleunigen. Die Wirkstoffkonzentration wurde in der wässrigen Phase ermittelt. Aus der Pufferphase wurden 2 Replikate aufgearbeitet und injiziert. Zur Quantifizierung der Substanzen wurden die validierten analytischen HPLC-Methoden eingesetzt (siehe Kap. 10.1.1). Für die Auswertung wurden Standardlösungen von 50 µg/mL für Steroide und 100 µg/mL für Koffein eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über eine Einpunktkalibrierung, da die Linearität und Richtigkeit in dem Arbeitsbereich bereits belegt wurde.

Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten erfolgte nach folgender Gleichung:

$$P = \frac{V_P \cdot (c_P^0 - c_P^1)}{V_O \cdot c_P^1} \quad \text{Gleichung 10.1}$$

V_P Volumen der wässrigen Phase

V_O Volumen der öligen Phase

c_P^0 Ausgangskonzentration der Substanz in der wässrigen Phase

c_P^1 Endkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase

10.4.2. K_{IAM} -Wert

Ca. 1 mg Substanz wurde in einen 25 ml Messkolben eingewogen und mit 1 ml DMSO angelöst, bevor bis zur Eichmarke mit Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 6,8 aufgefüllt wurde. Bei Clobetasolpropionat und bei Betamethasonvalerat war der Zusatz von 20% und

10% Acetonitril (v/v) dementsprechend für ausreichende Löslichkeit notwendig. Mometasonfuroat fiel bei Zusatz von 20% Acetonitril (v/v) wieder aus, 5 ml der Suspension wurden in einem 50 ml Messkolben mit 10 ml Acetonitril versetzt und mit Puffer bis zur Eichmarke aufgefüllt. Alle Substanzen wurden je dreimal injiziert.

Tab. 10.8: Zusammenfassung der analytischen Parameter für die K_{IAM} -Bestimmung

Analytische Parameter	
Analytisches Gerät	Waters Alliance 2795, 2996 PDA
Trennsäule	Material: Phosphatidylcholin gebunden an Silicapartikel 30 mm x 4,6 mm (Länge, ID) Hersteller: Regis
Mobile Phase	A: ACN B: Kaliumdihydrogenphosphat 0,01 mol/L pH 6,8
Chromatographischer Modus	Gradient, siehe Tab. 10.9
Fluss	0,8 mL min ⁻¹
Temperatur	RT (Säule), 20 °C (Autosampler)
Injektionsvolumen	10 µL
Wellenlängen/Messbereich	210 bis 400 nm
Analysenzyklus	20,00 min

Tab. 10.9: Gradient für die K_{IAM} -Bestimmung

Zeit (min)	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	100
1,5	0	100
12,0	75	25
13,5	75	25
15,0	0	100

Der System-Suitability Test wurde mit den Referenzsubstanzen (Uracil, Carbamazepin, Ketoprofen und Theophylin) durchgeführt. Die Messungen der Referenzsubstanzen wurden in einer Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Uracil diente als Totzeitmarker. Von den Referenzsubstanzen wurden bei –20 °C gelagerte Lösungen mit einer Konzentration von ca. 40 µg/mL verwendet. Vor und nach den Probeninjektionen erfolgte eine zweifache Injektion eines Blindwertes (Kaliumdihydrogenphosphatpuffer mit 1% DMSO).

Um nicht-substanzbezogene Signale in den Chromatogrammen zu minimieren, wurde bei allen Processingmethoden im Method-Set eine Subtraktion des 2. Blankchromatogramms von

den Substanzchromatogrammen festgelegt. Die Messungen des Totzeitmarkers Uracil wurden mit einer separaten Processingmethode ausgewertet. Die kürzeste Retentionszeit des Totzeitmarkers Uracil wird als Totvolumen in die entsprechende Processingmethode eingegeben. Die anderen Substanzen wurden mit einer Standardprocessingmethode bei den Wellenlängen 254, 275 und 290 nm ausgewertet. Das Chromatogramm mit der höchsten Absorption und/oder der symmetrischsten Peakform der Substanz wurde ausgewählt.

Anhand der erhaltenen UV-Spektren konnten die Substanzen identifiziert und deren Retentionszeiten ausgewertet werden. Unterschiede im lipophilen Charakter der Verbindungen äußern sich in verschiedenen Retentionszeiten. Der K_{IAM} -Wert wird aus den Retentionszeiten ermittelt und logarithmiert. Der mit Hilfe von Millenium 32 ermittelte k' -Wert der Substanz entspricht dem K_{IAM} -Wert und berechnet sich wie folgt:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} \quad \text{Gleichung 10.2}$$

k' Kapazitätsfaktor einer Substanz auf einer IAM-Säule

t_r Retentionszeit der Substanz

t_0 Retentionszeit des Totzeitmarkers (Uracil)

10.5. Proteinbindung

Ca. 1,0 mg Substanz wurde in 25 mL Messkolben abgewogen und mit 1 mL n-Propanol angelöst. Mit Kaliumphosphatpuffer 0,05 mol/L pH 7,4 wurde auf 25 mL ergänzt. Bei unvollständiger Lösung der Substanzen wurden die Messkolben ins Ultraschallbad gestellt. Bei Clobetasolpropionat und Betamethasonvalerat war ein höherer Prozentsatz n-Propanol bei größeren Gesamtvolumina für die Löslichkeit der Substanzen notwendig. Mometasonfuroat löste sich nicht vollständig. Da für die Säule aber nur ein Prozentsatz an n-Propanol bis 10% (v/v) verträglich ist, wurde die Mometasonfuroat-Suspension durch einen Membranfilter von 0,44 µm Porengröße filtriert und das klare Filtrat vermessen.

Tab. 10.10: Zusammenfassung der analytischen Parameter für Bestimmung der Proteinbindung

Analytische Parameter	
Analytisches Gerät	Waters Alliance 2690, Waters 2487 Dualwellenlängenmodus
Trennsäule	funktionalisiert mit Humanem Serum Albumin 50 mm x 4,6 mm (Länge, ID) Hersteller: Thermo Hypersil
Mobile Phase	Ammoniumacetat 0,05 mol/L pH 7,4 /n-Propanol 96:4 (v/v; %)
Chromatographischer Modus	Isokratisch
Fluss	0,8 mL min ⁻¹
Temperatur	37 °C (Säule), 10 °C (Autosampler)
Injektionsvolumen	20 µL
Wellenlängen/Messbereich	240 nm und 270 nm
Analysenzyklus	30,00 min

Vor und nach den Probeninjektionen erfolgte eine zweifache Injektion eines Blindwertes (Kaliumphosphatpuffer mit 4% n-Propanol).

Die k' -Werte der Testsubstanzen und Referenzsubstanzen wurden in den Wert $[k' / (k'+1)]$ umgerechnet. Aus den $[k' / (k'+1)]$ Werten der Referenzsubstanzen Paracetamol, Carbamazepin, Propranolol und Naproxen wurde eine Kalibriergerade erstellt. Diese Substanzen decken den gesamten Bereich der prozentualen Proteinbindung an HSA ab. Aus der erstellten Kalibriergeraden wurde für die Testsubstanzen das Proteinbindungspotential ermittelt.

10.6. Stabilität der Testsubstanzen

Die Substanzen wurden in klaren HPLC Vials eingewogen. Für jede Bedingung wurde ca. 1 mg Wirkstoff verbraucht. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Proben auf visuelle Änderungen geprüft und analysiert. Von jeder Substanz wurde zusätzlich 1 mg eingewogen, aufgearbeitet zur Analyse und vermessen. Diese Probe diente als Vergleichslösung.

10.6.1. Stabilität in Lösung

Nach Zugabe von 20 µL des entsprechenden Lösemittels (0,1 M HCl, 0,1 M NaOH, 0,3% H₂O₂, Wasser Eigen-pH, Phosphatpuffers pH 6,0 [USP 2006] Acetatpuffers pH 5,1 [USP 2006]) und 80 µL des Cosolvents (Acetonitril) zu jeder zweiten Probe mit Testsubstanz

wurden die Proben für 10 s auf dem Minishaker geschüttelt. Anschließend wurden die Vials offen über 4 Tage bei 60 °C eingelagert.

10.6.2. Stabilität der Feststoffe

Die Vials wurden offen über 4 Tage bei 60 °C, sowie über 4 Wochen bei 25 °C/60% r.F. und bei 40 °C/75% r.F. eingelagert.

10.6.3. Aufbereitung der Proben zur Analyse

Nach Ende der Inkubation wurden die Proben mit 1,0 mL des entsprechenden Lösemittels versetzt und 10 min geschüttelt. Anschließend wurden 150 µL entnommen und mit 1350 µL des entsprechenden Lösemittels im Vial verdünnt und injiziert. Zu diesem Zweck wurde für Koffein ein Gemisch von Acetonitril und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 3,5 1:20 (v/v; %) und für die Steroide ein Gemisch von Reinstwasser und Acetonitril 1:5 (v/v; %) als Lösemittel verwendet. Die Proben wurden mittels HPLC-UV-Methode analysiert (siehe Kap. 10.1.1).

10.6.4. Auswertung

Die Auswertung basiert auf einer 100%-Methode, wobei die Peakflächenprozentage das Verhältnis der Peakfläche der untersuchten Substanz zu der Summe von allen Peakflächen bei der jeweiligen Auswertewellenlänge repräsentieren.

10.7. Herstellung der Grundlagen für Phase I

Die Grundlagen wurden mit Hilfe eines Rotor-Stator-Systems an der Prozessanlage Becomix RW 2,5 hergestellt. Die Herstellung verlief gemäß den Anweisungen des Arzneibuches DAB 2004, DAC 1999 und Apothekenrezeptur und –defektur [DAB 2004, DAC 1999, Apothekenrezeptur und –defektur 2004]. Von jeder Grundlage wurde ca. 1 kg hergestellt.

10.9.4. Untersuchung der rheologischen Eigenschaften

Rheologische Untersuchungen der Salbenproben wurden direkt nach deren Herstellung an einem Rheometer Typ CVO/CS der Firma Bohlin Instruments durchgeführt. Als Messsystem diente eine Kegel-Platte-Einrichtung CP 4/40 mit einem Durchmesser von 40 mm und mit einem Kegelwinkel von 4° . Der Spaltenabstand betrug $150\ \mu\text{m}$. Die rheologischen Messungen erfolgten bei einer Temperatur von $20\ ^\circ\text{C}$.

Die Proben wurden mit einem Salbenspatel aus dem oberen Teil des Lagergefäßes entnommen. Die Messungen von Viskosität, Fließgrenze und Fließverhalten wurden in Einfachbestimmung durchgeführt. Die Oszillationsuntersuchungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung, wobei die Probe nach erfolgter Messung immer wieder neu aufgetragen wurde. Auf Grund der hohen Standardabweichungen bei der Oszillationsmessung wurden die Wollwachsalkoholsalbeprobe vorbehandelt. Um die entsprechende Homogenität der Wollwachsalkoholsalbeprobe zu gewährleisten, wurde zuerst die entnommene Salbenprobe mit einem Pistill in der Fantaschale für ca. 60 Sekunden durchgerührt und erst nach einer Minute Relaxationszeit vermessen. Rose hat in seiner Arbeit gezeigt, dass diese Art der Probenvorbereitung zu reproduzierbaren Ergebnissen führt [Rose 1999].

Die Messgrößen wie Viskosität, Fließgrenze, Phasenwinkel, elastischer und viskoser Modul wurden mit der Gerätesoftware ausgerechnet.

Die Parameter zur Aufnahme der Fließkurven der untersuchten Grundlagen sind in Tab. 10.14 aufgeführt.

Tab. 10.14: Einstellungen für die Aufnahme der Fließkurven

Grundlage	Basiscreme	Wollwachsalkoholsalbe	Carbomergel
Schubspannung	1 bis 200 Pa	1 bis 600 Pa	0,03 bis 75 Pa
Bereich	linear	linear	linear
Anzahl der Messwerte	60	60	60
Messzeit	120 Sekunden	60 Sekunden	120 Sekunden

Bei der Ermittlung der Fließgrenze wurden folgende Parameter eingestellt (Tab. 10.15).

Tab. 10.15: Einstellungen für die Bestimmung der Fließgrenze

Grundlage	Basiscreme	Wollwachsalkoholsalbe	Carbomergel
Schubspannung	1 bis 120 Pa	1 bis 450 Pa	0,03 bis 20 Pa

Die Parameter, bei denen die Oszillationsmessungen für alle untersuchten Grundlagen durchgeführt wurden, sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 10.16).

Tab. 10.16: Einstellungen für die Messungen der Oszillation

Grundlage	Basiscreme	Wollwachsalkoholsalbe	Carbomergel
Schubspannung	30 Pa	70 Pa	5 Pa
Anzahl der Messwerte	10	10	10
Frequenz	7,5 Hz	1 Hz	1 Hz

10.10. Wirkstofffreisetzung aus den Formulierungen

Wirkstofffreisetzungsuntersuchungen aus den Testformulierungen erfolgten nach Empfehlung der SUPAC-SS Guideline mit Hilfe der Franz-Diffusionszelle [Guidance for Industry SUPAC-SS 1998, Guidance for Industry SUPAC-SS 1997].

Die Dialysemembran Typ 10.17 (Dicke $8,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$, MWC 10000, Dianorm GmbH, München, D) wurde mit einem Locheisen auf die Größe der FZ ausgestanzt und 30 Minuten in Puffer gequollen. Es wurden ca. 300 mg der Testformulierung auf die Membran aufgetragen, gleichmäßig verteilt und mit Parafilm® abgedeckt, damit während des Versuches keine Veränderungen in der Zusammensetzung (z.B. durch Verdunstung von Lösemittel) erfolgten. Diese Durchführung entsprach einer „infinite-dose“ Bedingung. Die Untersuchung wurde in einer Sechsfachbestimmung für alle Prüfmuster durchgeführt. Die Proben aus dem Akzeptor wurden über einen Zeitraum von sechs Stunden (Zeitpunkte nach 0,5; 1; 2; 3; 4; und 6 Stunden) gezogen. Ein Aliquot (300 μL) der Akzeptorphase wurde bei jedem Zeitpunkt entnommen und mit frischem temperierten Puffer aufgefüllt, so dass die Unterseite der Membran über die gesamte Versuchszeit in Kontakt mit dem Akzeptormedium blieb. Als Akzeptormedium wurde ein Wasser/Methanol-Gemisch 50:50 (v/v; %) für die Freisetzung von Steroiden aus den untersuchten Formulierungen und Krebs-Ringer-Bikarbonat (KRB) Puffer pH 7,4 für die Koffeinfreisetzung aus der Wollwachsalkoholsalbe und Basiscreme benutzt. Der Versuch wurde bei einer Temperatur von 32 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 400 rpm durchgeführt. Die Franz-Zellen besaßen eine Diffusionsfläche von ca. 1,77 cm² und ein Akzeptorvolumen von ca. 12 mL (Abb. 10.3). Die Analytik erfolgte mittels HPLC (siehe Kapitel 10.1.1).



Abb. 10.3: Bei den Freisetzungsversuchen verwendete Franz-Zelle

Zur Auswertung wurden die Steigungen der Regressionsgeraden verglichen, die sich durch die Auftragung der Menge des freigesetzten Wirkstoffes pro Fläche ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) über die Wurzel der Zeit ergaben.

10.11. Haut

Die Verfügbarkeit der Haut war durch die Art der veranlassten, operativen Eingriffe vorgegeben. Die Entnahme der Häute war nicht ursächlich durch den in-vitro Versuch bedingt. Das Einverständnis der Patienten zur wissenschaftlichen Verwertung bzw. Entsorgung der Haut lag der Klinik vor. Nach Vorgabe der Richtlinien und Abgabe des exkorporierten Materials aus dem OP wurde die Haut bei 4 °C gekühlt und mit trockener Oberfläche transportiert. Hier wurde darauf geachtet, dass kein Kontakt zwischen dem subkutanen Fettgewebe und der Hautoberfläche zustande kam. Nach der Überführung in das Labor wurde die Haut von dem subkutanen Fettgewebe befreit und mit einer internen Verschlüsselung der Firma Across Barriers (Hautnummer) versehen. Die Haut wird maximal über 6 Monate bei einer Temperatur von –20 °C aufbewahrt.

10.11.1. Hitzeseparation

Die hitzeseparierte Epidermis wurde vor dem Versuchsansatz frisch hergestellt.

Zur Separation der Haut wurde eine Stanze mit einem Durchmesser von 18 mm aus gefrorener Haut entnommen und kurz aufgetaut. Damit die Hautstücke nicht austrocknen, wurden diese in eine mit Wasser gefüllte Petrischale überführt und von oben mit einem befeuchteten Rundfilter bedeckt. Die Hautproben wurden anschließend in das auf 60 °C

temperierte Wasser überführt. Nach 90 Sekunden, in denen die Haut vorsichtig mittels Magnetrührern bewegt wurde, wurden alle Hautstücke aus dem Wasser entnommen und mit dem Stratum corneum nach unten wieder in eine Petrischale mit Wasser überführt. Von oben wurden diese wieder mit Rundfiltern bedeckt. Anschließend wurde eine Hautstanze nach der anderen bearbeitet. Zu diesem Zweck wurde das Hautstück mit der Dermis auf einen Rundfilter gelegt. Es erfolgte eine mechanische Abtrennung der Epidermis von der Dermis mit Hilfe zweier anatomischer Pinzetten. Die separierte Epidermis wurde in eine Petrischale mit Wasser gegeben (mit der Stratum-corneum-Seite nach oben), um sich flächig ausbreiten zu können. Nach 30 Minuten der Hydratisierung entfaltete sich die präparierte Epidermis vollständig. Anschließend wurde diese mit einem Stück Aluminiumfolie aus dem Wasser gehoben.

Die Dicke der hitzeseptierten Haut wurde mit einem Gerät der Firma Heidenhain exemplarisch an fünf verschiedenen Stellen vermessen. Die Ergebnisse dieser Dickenmessungen sind in Tab. 10.17 und Tab. 10.18 aufgelistet.

Tab. 10.17: Angaben zur verwendeten Haut in der Phase I

Hautnummer	Geschlecht	Alter	BMI	Körperregion	Hautdicke		
					MW [μm]	SD [μm]	RSD [%]
218-01-1005	weiblich	43	22,1	Bauchhaut	72,00*	5,35*	7,44*
221-01-1105	weiblich	43	33,4	Bauchhaut	100,33*	2,49*	2,49*

*n=3

In der Phase II, während der Formulierungsoptimierung, wurde die Haut Nr. 242-01-0406 für die Permeationsversuche mit Hydrocortison und Testosteron verwendet. Haut 246-01-0506 wurde bei den Versuchen mit Koffein eingesetzt.

Tab. 10.18: Angaben zur verwendeten Haut in der Phase II

Hautnummer	Geschlecht	Alter	BMI	Körperregion	Hautdicke		
					MW [μm]	SD [μm]	RSD [%]
242-01-0406	weiblich	31	27,3	Bauchhaut	82,67*	9,10*	11,00*
246-01-0506	weiblich	26	22,4	Bauchhaut	68,24**	13,70**	20,08**

*n=9, **n=5

10.11.2. Dermatomisieren

Die aufgetaute Humanhaut wurde mit dem Akkudermatom Aesculap GA 630 auf eine Dicke von ca. 500 μm dermatomisiert. Die Hautoberfläche mit intaktem Stratum corneum wurde dabei nach oben gerichtet und von dieser Seite mit dem Dermatom bearbeitet.

Die Dicke der dermatomisierten Haut wurde mit einem Gerät der Firma Heidenhain pro Hautstanze an fünf verschiedenen Stellen vermessen. Der Hautdickemittelwert von allen verwendeten Hautstücken (n=12) ist in Tab. 10.19 dargestellt.

Tab. 10.19: Angaben zur verwendeten dermatomisierten Haut in der Phase I, n=12

Hautnummer	Geschlecht	Alter	BMI	Körperregion	Hautdicke		
					MW [μm]	SD [μm]	RSD [%]
193-01-1204	weiblich	37	31	Bauchhaut	556,67	20,25	3,64

10.12. Permeationsexperimente

10.12.1. Berechnung von P_{app} -Wert und Lag Phase

Die Berechnung des P_{app} -Werts in cm/s und der Lag Phase in h erfolgte nach einer von Niedorf et al. vorgeschlagenen Methode aus dem linearen Teil der Regressionsgerade, der mindestens sechs Messpunkte in diesem Bereich enthält [Niedorf et al. eingereicht].

10.12.2. Transport über hitzeseparierte humane Haut

Der Transport über hitzeseparierte humane Haut wurde in statischen Franz-Zellen durchgeführt (Abb. 10.4). Die aus Glas gefertigten, zylindrischen Franz-Zellen als Diffusionskammern bestehen aus einem Ober- und Unterteil, zwischen denen die Hautproben mittels Schnappverschluss eingespannt werden. Das untere Kammervolumen (Akzeptor) besitzt ein Volumen von ca. 8 mL, während das obere Kammervolumen (Donor) variabel ist.



Abb. 10.4: Bei den Permeationsversuchen verwendete Franz-Zelle

Die Haut wurde unmittelbar vor dem Einbau vorbereitet und in die Franz-Zellen überführt, so dass das SC nach oben gerichtet war. Die Diffusionsfläche betrug ca. $0,5 \text{ cm}^2$. $50 \pm 2 \text{ mg}$ der Formulierung wurde auf die Hautoberfläche in der Franzzelle appliziert ($100 \text{ mg pro } 1 \text{ cm}^2$)

und gleichmäßig verteilt. Als Akzeptormedium wurde Krebs-Ringer-Bikarbonat (KRB) Puffer mit einem pH von 7,4 benutzt. Um die entsprechende Löslichkeit der Corticosteroide in dem Akzeptorpuffer zu sichern, wurde der KRB-Puffer bei den Versuchen mit Betamethasonvalerat, Clobetasolpropionat und Mometasonfuroat mit 1% BSA versetzt. Das Medium wurde auf 32 °C temperiert und kontinuierlich bei 400 U/min gerührt. Die Untersuchungen zur Permeation erstreckten sich mindestens über 24 h.

Permeationsexperimente in der Phase I

Eine Entnahme von Proben (200 µL) aus dem Akzeptormedium erfolgte zu mindestens neun Zeitpunkten über eine Versuchszeit von mindestens 26 Stunden. Der Versuch wurde in einer Dreifachbestimmung für alle Prüfmuster durchgeführt. Die Wirkstoffkonzentration wurde mittels HPLC bestimmt (Kap. 10.1.1).

Permeationsexperimente in der Phase II

Die Probenentnahme (300 µL) fand nach 6 und 24 Stunden statt. Die Permeationsexperimente wurden mindestens in einer vierfachen Bestimmung durchgeführt.

Die Substanzkonzentration in den gezogenen Proben wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt (Kap. 10.1.2).

Das Verhältnis der Permeationsbeschleunigung wurde folgendermaßen berechnet:

$$PBV = \frac{P_{(enh)}}{P_{(Kontrolle)}} \quad \text{Gleichung 10.3}$$

$P_{(enh)}$	permeierte Wirkstoffmenge aus der Formulierung mit Permeationsenhancer nach 24 h [dpm]
$P_{(Kontrolle)}$	permeierte Wirkstoffmenge aus der Formulierung ohne Permeationenhancer (Kontrolle) nach 24 h [dpm]

10.12.3. Transport über dermatomisierte Humanhaut

Der Transport über dermatomisierte humane Haut wurde in den Franz-Zellen mit der Diffusionsfläche von 1,77 cm² und mit einem Akzeptorvolumen von ca. 12 mL durchgeführt (Abb. 10.3). Als Akzeptormedium wurde Krebs-Ringer-Bikarbonat (KRB) Puffer mit einem pH von 7,4 benutzt. Das Medium wurde auf 32 °C temperiert und kontinuierlich bei 400 U/min gerührt. Die Untersuchung zur Permeation durch die dermatomisierte Haut ins Akzeptormedium erstreckte sich über 25 h. Eine Entnahme von Proben zu 300 µL aus dem

Akzeptormedium erfolgte zu dreizehn Zeitpunkten (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20, 21, 22, 23, 24 und 25 h). Der Versuch wurde in einer Vierfachbestimmung für alle Prüfmuster durchgeführt.

Auf die Haut in der FZ wurden jeweils ca. 100 mg der Formulierung pro 1 cm² der Diffusionsfläche appliziert und gleichmäßig auf der Hautprobe verteilt. In die Testosteronformulierung wurde eine kleine Menge des radioaktiven Testosterons ([4-¹⁴C]-Testosteron) eingearbeitet, so dass die Radioaktivität der benutzten Grundlage 0,0093 MBq/g betrug. Der Donor enthielt somit 0,5% Toluol (v/v). Die Testosteronkonzentration in den Proben wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt (Kap. 10.1.2).

10.12.4. Transport über Episkin[®]

Episkin[®] (Hersteller: L'Oreal, Modelltyp: Keratinozytenmodell, 12-Well Costar plate)

Charge: 05-EPIS-014 (J13)

Das Humanhautmodell, Episkin[®], wird auf einem Kollagen I und Kollagen IV Layer kultiviert. Im Kollagen I treten kleinere Vakuolen auf, die eine Elastizität der Stützmembran bewirken. Das Stratum corneum bildet die obere Seite des Transwell inserts und Kollagen die basale Seite.



Abb. 10.5: Kulturplatte mit Episkin[®]

Eine versiegelte Zellkulturplatte mit Episkin[®]-Proben auf Agarosegelen und Erhaltungsmedium gehören zu den Kitbestandteilen des Modells. Nach der Lieferung der Kunsthaut wurden die Vertiefungen der 12-well-Platte unter sterilen Bedingungen mit je 2 mL des auf Raumtemperatur erwärmten Erhaltungsmediums befüllt. Das Hautmodell mitsamt der stützenden Kollagenschicht wurde vom Agarosegel abgelöst. Die Kunsthäute wurden unter sterilen Bedingungen in eine 12-well-Platte überführt, ohne dass sich Luftblasen unter der Kunsthaut befanden. Die Kunsthäute wurden im Brutschrank (bei 37 °C und 5% CO₂) mindestens 1 Stunde, maximal aber 48 Stunden lang aufbewahrt. Bei einer Lagerung von mehr als 24 Stunden erfolgte nach 24 Stunden ein Mediumwechsel.

In die Testosteronformulierung wurde eine kleine Menge radioaktiven Testosterons ($[4-^{14}\text{C}]$ -Testosteron) eingearbeitet, so dass die Radioaktivität der benutzten Grundlage 0,0093 MBq/g betrug. Der Donor enthielt somit 0,5% Toluol (v/v).

Der Transport über Episkin[®] wurde direkt in den Transwell inserts durchgeführt, was in Abb. 10.6 dargestellt ist.

Der Versuch wurde in einer Dreifach-Bestimmung für die Basiscreme und die Wollwachsalkoholsalbe und in einer Zweifach-Bestimmung für das Carbomergel durchgeführt.

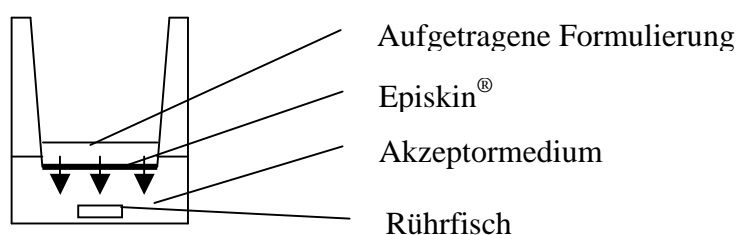


Abb. 10.6: Schematische Darstellung des Transports im Transwell insert

Die Diffusionsfläche betrug ca. $1,07\text{ cm}^2$. Als Akzeptormedium wurde Krebs-Ringer-Bikarbonat (KRB) Puffer mit einem pH von 7,4 benutzt. Das Akzeptorvolumen betrug 1,5 mL. Das Medium wurde auf 32 °C temperiert und kontinuierlich bei 400 U/min mit Hilfe eines Rührfischs (1 mm breit und 4 mm lang) gerührt. Auf die Episkin[®]-Proben wurden jeweils ca. 100 mg der Formulierung pro 1 cm^2 Diffusionsfläche aufgetragen und gleichmäßig auf dem Hautmodell verteilt. Die Untersuchungen zur Permeation mit Episkin[®]-Modell erstreckten sich über 9 h. Eine Entnahme von Proben zu $300\text{ }\mu\text{L}$ aus dem Akzeptormedium erfolgte zu zwölf Zeitpunkten. Die erste Probenentnahme fand nach einer Stunde statt. Die Testosteronkonzentration wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt (Kap. 10.1.2).

10.13. Formulierungsstabilität

Die Stabilitätsmuster wurden in 10 g Salbenkruken abgefüllt und der folgenden Stabilitätsprüfung unterworfen.

Die Stabilitätsproben wurden einer Stressbelastung, dem Schaukeltest, unterworfen. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte in einem programmierbaren Kühl-Brutschrank RUMED, Typ 3401 (Rubarth Apparate GmbH, D-Laatzen). Die Temperaturschaukelungen erfolgten bei -5 °C bis $+40\text{ °C}$ jeweils für 12 Stunden im täglichem Rhythmus. Der zeitliche Verlauf der Lagerprogramme ist in Abb. 10.7 zusammengefasst.

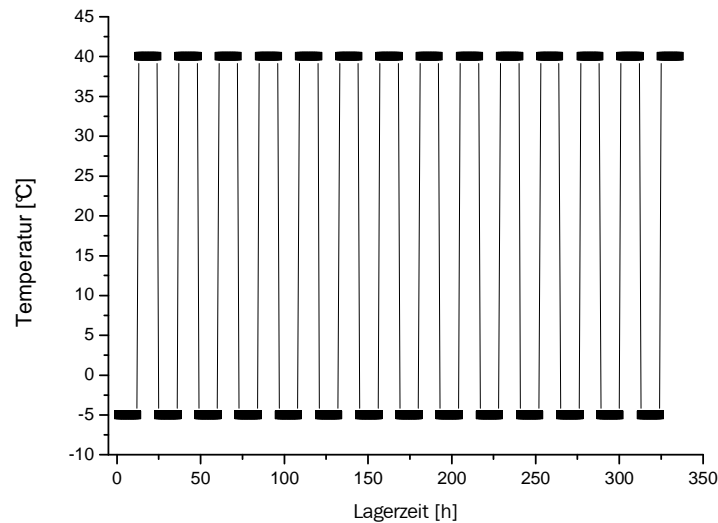


Abb. 10.7: Temperaturverlauf im Schaukeltest über die Lagerzeit

10.13.1. Visuelle Beurteilung

Makroskopisch

Die Prüfmuster wurden makroskopisch während der Stabilitätsprüfung auf folgende Änderungen wie Farbkontrast, Homogenität, Phasentrennung und Ausölen kontrolliert.

Mikroskopisch

Um die Veränderungen in der Struktur, wie z.B. Kristallwachstum, beobachten zu können, wurden die mikroskopischen Aufnahmen der Prüfmuster mit einem Zeiss Photomikroskop (Axio Imager.Z1, Firmware-Version 01.209, Main Control) bei einer 100- und 200-fachen Vergrößerung gemacht. Die Probe wurde mit einem Mikrospatel auf den Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Einschätzung der Größenverhältnisse und Bearbeitung der Bilder, wie Kontrast-, Helligkeits-Einstellung, erfolgte mittels Gerät-Software (Carl Zeiss Imaging System, Axio Vision LE, 25 Software Release 4.4).

Objektive: Zeiss EC Plan-Neofluar 10x / 0,3 Ph1

Zeiss Plan-Apochromat 20x / 0,8

Kamera: AxioCam MRm

10.13.2. pH Kontrolle

Die Messung des pH-Werts erfolgte am pH-Meter Orion model 330. Der pH-Wert wurde nur für die Rezepturen auf der Basis von Carbomergel und Basiscreme bestimmt. Die Bestimmung erfolgte potentiometrisch nach Ph. Eur. 2.2.3 mit einer Glaselektrode für viskose Proben (Orion 91-72 Sure Flow[®] pH Elektrode). In 1 g der Basiscremeproben wurde vor der Messung 1,3 mL Wasser eingearbeitet. Die Carbomergelproben wurden ohne weitere Aufarbeitung direkt in den Salbenkruken vermessen.

Für die Grundlagen aus der zweiten Arbeitsphase wurde eine Elektrode vom Typ FB67107/BNC verwendet.

10.13.3. Viskositätsprüfung

Die Messungen wurden an einem Brookfield RVT, Synchro-Lectric Viskosimeter (Spindel F) mit Schergeschwindigkeitsvorgabe (Drehzahl in $[s^{-1}]$: 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 50 und 100) durchgeführt. Die Schubspannung der Proben wurde in Skalenteilen gemessen. Bei der Ergebnissauswertung wurden nur die gemessenen Schubspannungen bei $100 s^{-1}$ verglichen.

10.13.4. Gehaltsbestimmung (Extraktionsverfahren)

Zur Gehaltsbestimmung der Stabilitätsmuster wurden 100 mg der Formulierung (bzw. 50 mg der Formulierung mit Koffein) aus dem oberen, mittleren und unteren Bereich der Probengefäße in den 15 mL verschraubbaren Zentrifugengefäßen eingewogen. Es erfolgte die Zugabe von 10 mL Ethanol. Die resultierende Mischung wurde 30 Minuten im Ultraschall behandelt und nachher kräftig geschüttelt. Die festverschlossenen Zentrifugengefäße mit den Salben- und Cremeproben wurden zunächst für 30 Minuten bei 60 °C ins Wasserbad gestellt und wieder geschüttelt, bis sich die eingewogene Probe homogen in Ethanol verteilt hatte. Der letzte Schritt war wiederum eine Behandlung im Ultraschall für 15 Minuten. Die Gelformulierungen konnten so ohne weitere Aufarbeitung in die HPLC-Vials abgefüllt und mittels HPLC vermessen werden. Die Salben- und Cremeproben wurden vor der Messung filtriert (Syringe Driven Filter, 0,45 μm , Low Protein Binding Durapore). Die theoretische Konzentration der auf diese Weise vorbereiteten Messlösungen betrug 10 $\mu g/mL$ (bzw. 5 $\mu g/mL$ für Formulierungen mit Koffein). Matrix-Effekte, die sich auf die Selektivität der HPLC-Analytik auswirken könnten, wurden nicht festgestellt.

Beispielhafte Chromatogramme für die Gehaltsbestimmung in den Proben sind in den Abbildungen 10.8-10.10 dargestellt.

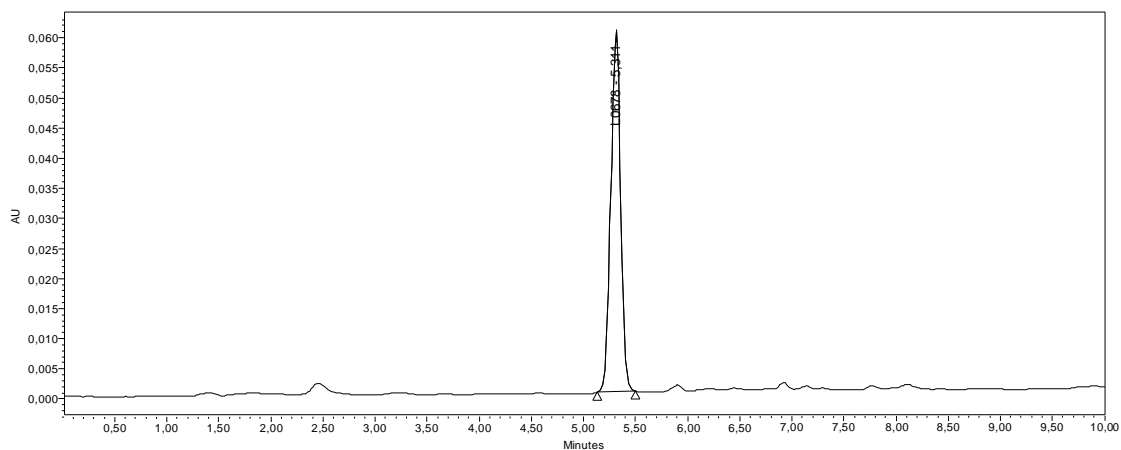


Abb. 10.8: Beispielhaftes Chromatogramm für die Gehaltsbestimmung von Betamethasonvalerat aus der Wollwachsalkoholsalbe (Konzentration: 10,957 $\mu\text{g/mL}$).

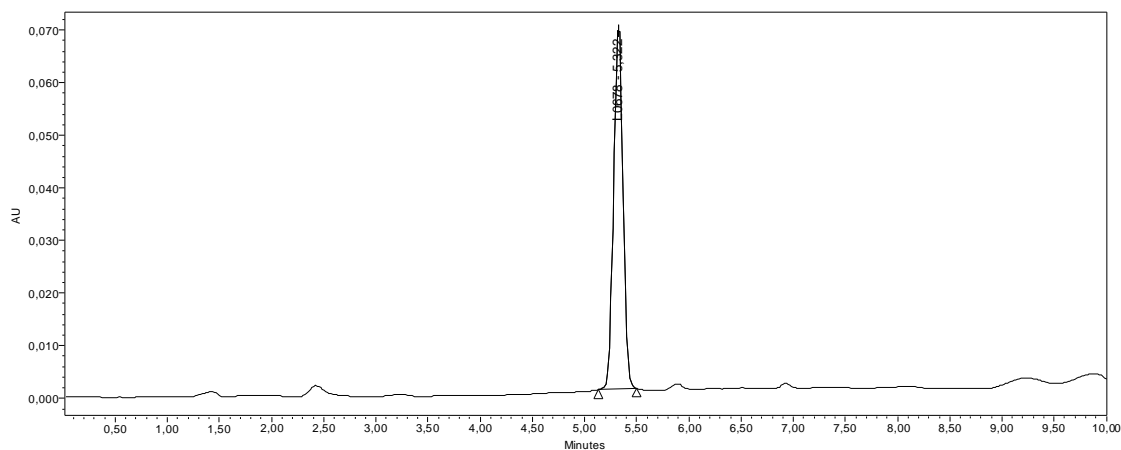


Abb. 10.9: Beispielhaftes Chromatogramm für die Gehaltsbestimmung von Betamethasonvalerat aus der Basiscreme (Konzentration: 11,951 $\mu\text{g/mL}$).

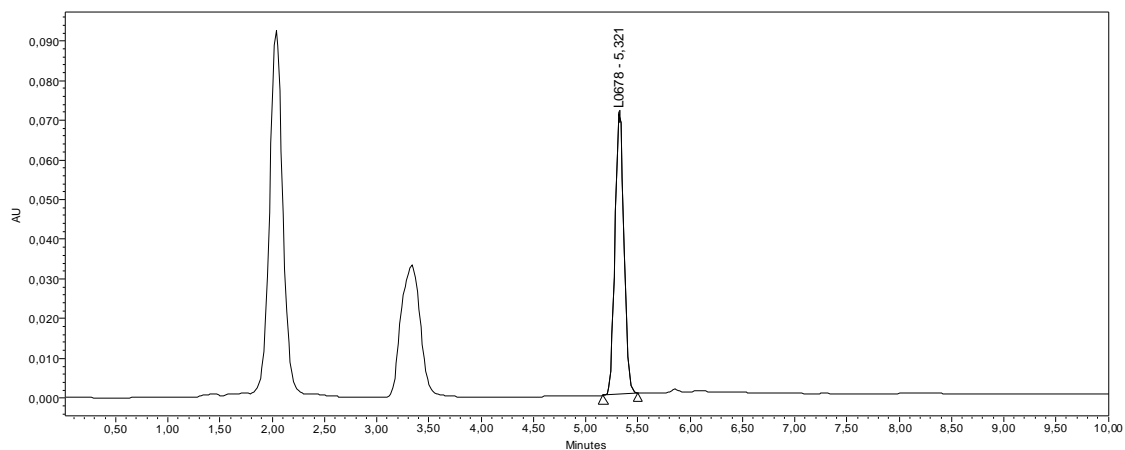


Abb. 10.10: Beispielhaftes Chromatogramm für die Gehaltsbestimmung von Betamethasonvalerat aus dem Carbomergel (Konzentration: 11,790 $\mu\text{g/mL}$).

10.13.5. Freisetzung

Die Experimente wurden wie im Kapitel 10.10. beschrieben durchgeführt.

Es wurde bei der Auswertung geprüft, ob das 90%-Konfidenzintervall eingehalten wurde. Nach Ermittlung der Steigung für jede einzelne Franzelle wurden die Quotienten aus diesen 12 Werten (6 für Formulierung vor Einlagerung und 6 für Formulierung nach der Stabilitätsuntersuchung) gebildet. Die 36 auf diese Weise erhaltenen Quotienten wurden der Größe nach (vom kleinsten bis zum größten Wert) geordnet. Der achte und der 29. Wert bildeten die Unter- und Obergrenze des 90%-Konfidenzintervalls. Hierbei muss der achte Wert größer als 0,75 (bzw. 75%) und der 29. Wert kleiner als 1,3333 (bzw. 133,33%) sein.

Falls diese Anforderungen bei der SUPAC-SS Methode nicht eingehalten werden sollten, werden weitere Versuche in 12-facher Bestimmung durchgeführt und aus den insgesamt 18 x 18 Werten des ersten und zweiten Abschnittes zusammen 324 Quotienten gebildet. Auf dieses Verfahren (zweiter Abschnitt) wurde hier verzichtet.

10.14. Herstellung der Grundlagen für Phase II

Herstellung Aqua conservans

Tab. 10.20: Zusammensetzung Aqua conservans

Methyl-4-hydroxybenzoat	0,700 g
Propyl-4-hydroxybenzoat	0,300 g
Aqua purificata	Ad 1000 mL

Die Benzoate wurden in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und mit frisch abgekochtem demineralisiertem Wasser aufgefüllt. Bei 90 °C wurde für ca. eine Stunde auf dem Magnetrührer gerührt, anschließend im kalten Wasserbad auf 20 °C abgekühlt und mit demin. Wasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Herstellung Carbomergel DAB

Tab. 10.21: Zusammensetzung Carbomergel

Carbomer	8,00 g
NaOH 5% (m/v)	48,00 g
Aqua conservans	744,00 g

Aqua conservans wurde in der MPL (Multi-Purpose Laboratory Mixer) vorgelegt, Carbomer zugegeben. Nun wurde für 3 Minuten bei eingeschaltetem Abstreifer mit 3000 Umdrehungen pro Minute gerührt. NaOH wurde zugeben und bei gleichen Bedingungen nochmals für 3 Minuten gerührt. Anschließend wurde die Drehzahl auf ca. 300 U/min reduziert und für weitere 3 Minuten unter Vakuum nochmals gerührt.

Herstellung HPMC-Gel

Tab. 10.22: Zusammensetzung HPMC-Gel

Metolose 90SH-100	16,00 g
Aqua cons.	184,00 g

Aqua conservans wurde unter Rühren auf dem Magnetrührer auf 90 °C erhitzt. Die Metolose wurde unter intensivem Rühren langsam zugegeben. Die Heizung wurde nach 10 Minuten abgeschaltet, die Rührleistung reduziert und so lange es die Viskosität zuließ, weitergerührt. Das Gel wurde über Nacht (Ansätze G 2, 3, 4, 5, 6 und 7), bzw. für 3 Stunden (Ansätze G 1, 8, 9, 10, 11, 12 und 13) stehen gelassen. Verdampfendes Wasser wurde nach Erkalten ersetzt.

Herstellung der Zuckerester-Gele

Die abgewogenen Mengen an Zuckerester wurde im Erlenmeyerkolben mit Aqua conservans versetzt und auf dem Magnetrührer bei 80 °C bis zur Lösung gerührt. Danach wurde die Heizung ausgeschaltet und bis zum Erkalten weitergerührt.

Herstellung des Ansatzes G1

50 g Carbomergel, 25 g Aqua conservans und 25 g HPMC-Gel wurden in eine 200 mL Unguatorekruke eingefüllt und für 3 Minuten bei mittlerer Drehzahl im Unguator unter Auf- und Abbewegen homogenisiert. Das erhaltene Gel wurde in eine 100 mL Kruke überführt.

Herstellung der Ansätze G 2, 3, 4

25,00 g HPMC-Gel wurden in eine 50 mL Unguatorekruke eingewogen. Die entsprechende Menge an Isopropylmyristat wurde zugefügt und mit Aqua conservans auf 50,00 g aufgefüllt. Mit einem UltraThurrax wurde bei ca. 13500 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten homogenisiert. Die so erhaltene Emulsion wurde möglichst vollständig in eine 200 mL Unguatorekruke gewogen, mit der gleichen Menge Carbomergel versetzt und für 3 Minuten im

Unguator unter Auf- und Abbewegen homogenisiert. Die erhaltene Emulsion wurde in eine 100 mL Kruke überführt.

Herstellung der Ansätze G 5, 6, 7

25,00 g HPMC-Gel wurden in eine 200 mL Unguatorkruke eingewogen. Die entsprechende Menge an Propylenglycol wurde zugefügt und mit Aqua conservans auf 50,00 g aufgefüllt. 50,00 g Carbomergel wurden zugesetzt und für 3 Minuten im Unguator unter Auf- und Abbewegen homogenisiert. Das erhaltene Gel wurde in eine 100 mL Kruke überführt.

Herstellung der Ansätze G 8, 9, 10

25,00 g HPMC-Gel wurden in eine 200 mL Unguatorkruke eingewogen und die entsprechende Menge an Zuckerestergel zugefügt. 50,00 g Carbomergel wurden zugesetzt und für 3 Minuten im Unguator unter Auf- und Abbewegen homogenisiert. Das erhaltene Gel wurde in eine 100 mL Kruke überführt.

Herstellung der Ansätze G 11, 12, 13

25,00 g HPMC-Gel wurden in eine 50 mL Unguatorkruke eingewogen. Die entsprechende Menge an Isopropylmyristat wurde zugefügt und mit Aqua conservans auf 50,00 g, minus der Menge an Propylenglycol aufgefüllt. Mit einem UltraThurrax wurde bei ca. 13500 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten homogenisiert. Die so erhaltene Emulsion wurde möglichst vollständig in eine 200 mL Unguatorkruke gewogen, mit der gleichen Menge Carbomergel, sowie der prozentual korrigierten Menge an Propylenglycol versetzt und für 3 Minuten im Unguator unter Auf- und Abbewegen homogenisiert. Die erhaltene Emulsion wurde in eine 100 mL Kruke überführt.

10.15. Viskositätsbestimmung der Grundlagen aus der Phase II

Rheologische Untersuchungen der Grundlagen aus der Phase II wurden an einem Rheometer Typ RC20-CPS der Firma Rheotec GmbH durchgeführt. Als Messsystem diente die Kegel-Platte-Einrichtung C50-1 mit einem Durchmesser von 50 mm und mit Kegelwinkel von 1°. Der Spaltenabstand betrug 50 µm. Die Proben wurden in einem Schubspannungsbereich von 0 bis 200 Pa über eine Messzeit von 120 Sekunden untersucht, wobei die Messpunktzahl 25 betrug. Die rheologischen Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25 °C in einer Dreifachbestimmung. Die Messgrößen wie Viskosität und Fließgrenze wurden mit der Gerätesoftware, Rheo2000 Software V2.7, ausgerechnet.

10.16. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die Daten wurden statistisch mit Hilfe des Student t-Tests auf einem 95%igen Konfidenzniveau ausgewertet. $P < 0,05$ wurde als Hinweis auf einen signifikanten Unterschied gewertet.

10.17. Liste der verwendeten Substanzen und Geräten

Tab. 10.23: Chemikalien und Referenzsubstanzen

Substanz	Lieferant/Hersteller	Artikelnummer	Charge
[1,2,6,7- ³ H]-Hydrocortison	Amersham Biosciences	TRK407	124
[1,2,6,7- ³ H]-Testosteron	Amersham Biosciences	TRK402	110
[1-Methyl- ¹⁴ C]-Koffein	American Radiolabeled Chemicals	ARC-0235	060523
[4- ¹⁴ C]-Testosteron	Amersham Biosciences	CFA129	75
Ammoniumacetat	Fluka	09689	434084/1
Betamethasonvalerat	Synopharm	700103-0006	0406A001
Carbamazepin	Sigma	C4024	093K1545
Carbomer 980	Synopharm	700143	0405A147
Cetylalkohol	Caelo	2057	40233194 42031414
Clobetasolpropionat	Synopharm	700225-0005	0404A151
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka	60356	448772/1
Dimethylsulfoxid	Sigma	154938	05754KD
Glycerinmonostearat "60"	Caelo	2249	41417414
Hydrocortison	Synopharm	157015-0004	0308A160
Isopropylmyristat	Sigma-Aldrich	M0757	046K0678
Isopropylmyristat	Cognis	-	CB 31750004
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR	1.04873.1000	A585773445
Ketoprofen	Sigma	K1751	093K1522
Koffein	Sigma-Aldrich	C0750-1006	014K0026
Macrogol-20-Glycerolmonostearat (Tagat [®] S 2 rein pflanzlich) Typ II	Caelo	3467	41709384
Metolose 90SH 100	ShinEtsu Chemical Co.	90SH-100	412305
Methyl-4-hydroxybenzoat	Synopharm	172620-0001	0412A042
Miglyol 812 (Mittelkettige Triglyceride)	Caelo	3274	41659274
Mometasonfuroat	Crystal Pharma	-	C266P060

Natriumhydroxid	Caelo	2450	40929494
Propyl-4-hydroxybenzoat	Synopharm	200820-0001	0406A036
Propylenglycol	Aug. Hedinger	200-338-0	029293B
Propylenglycol	BASF	-	00249175L0
Saccharosestearat	Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation	S-1670	64258101
Testosteron	Synopharm	700277-0004	0311A131
Theophyllin	Fluka	88308	1078773
Uracil	Sigma	U0750	98H3630
Weißes Vaseline	Caelo	3200	42694404

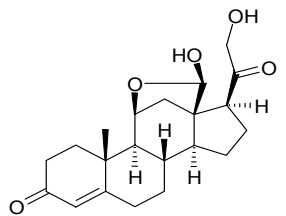
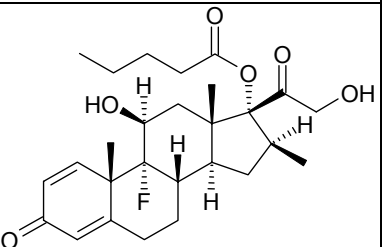
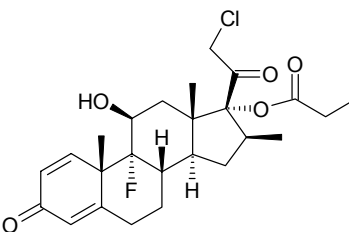
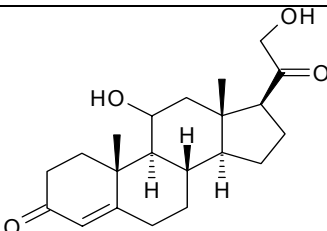
Tab. 10.24: Eingesetzte Materialien und Geräte

Gerät	Lieferant/Hersteller
NepheloStar Galaxy	Firma BMG Labtech
DSC 820	Mettler-Toledo
Minishaker (NS2)	IKA
Mehrkanalpipette 2-300 µL	Eppendorf
Eppendorfpipette 2-20 µL	Eppendorf
Mikrotiterplatten 96 well	Thermo Electron
Rotationsrheometer	Rheotec GmbH
Peltiertemperierung	Rheotec GmbH
C50-1 Messkörper	Rheotec GmbH
Überkopfschüttler Reax	Heidolph
Semi Mikrowaage SBC22	Scaltec
Runge Penetrometer PNR	Firma Sommer und Runge, KG Berlin
Bohlin Rheometer CVO/CS	Bohlin Instruments
CP 4°/40 mm	Bohlin Instruments
Kühl-Brutschrank RUMED Typ 3401	Rubrath Apparate GmbH, D-Laatzten
Synchro-Lectric Viscometer (Spindel F)	Brookfield RVT
Zeiss Mikroskop	Zeiss, D-Oberkochen

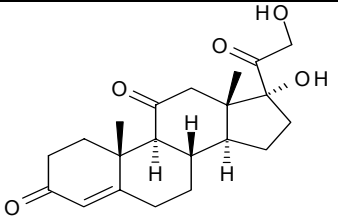
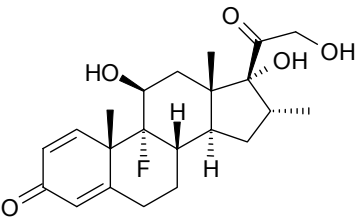
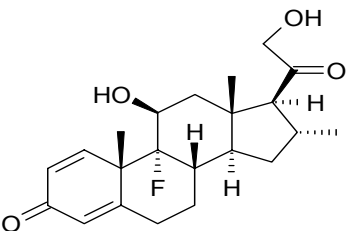
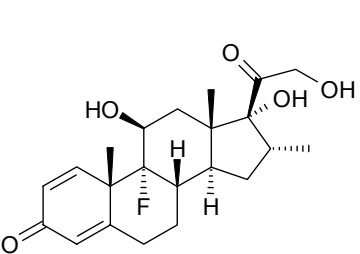
Tab. 10.25: Eingesetzte Software

Gerät	Software
Waters Alliance 2695	Millenium 32 Version 4.0
NepheloStar Galaxy	NephelostarControl Software V4.10-0
Rotationsrheometer	Rheo2000 Software V2.7
Bohlin Rheometer CVO/CS	Bohlin Software V5.40
Zeiss Mikroskop	Carl Zeiss Imaging System, Axio Vision LE, 25 Software Release 4.4

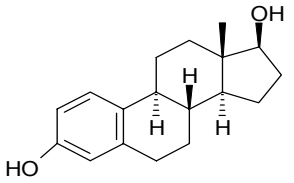
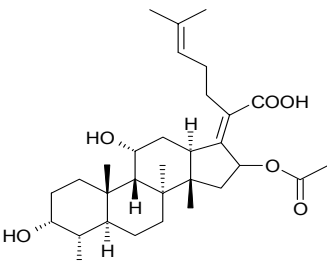
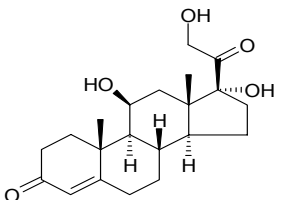
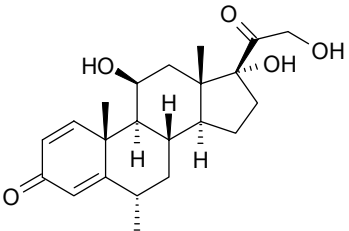
Anhang 1: Substanzliste mit physikochemischen Angaben

Struktur	Substanz (Handelsname)	CAS Nr.	Chemischer Name IUPAC-Bezeichnung	Summen- formel	MW [g/mol]	Steroidegruppe	Log P-Werte aus Literatur
	Aldosteron	52-39-1	(11 β)-11,21-Dihydroxy-3,20-dioxo-pregn-4-en-18-al	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360,45	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Mineralcorticoide	1,08 (5) 0,73 (6)
	Betamethason- valerat	2152-44-5	9-fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 β -methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-17-valerat	C ₂₇ H ₃₇ FO ₆	476,59	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	3,6 (5) 3,98 (6)
	Clobetasol- propionat	25122-46-7	21-Chlor-9-fluor-11 β ,17-dihydroxy-16 β -methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion-17-propionat	C ₂₅ H ₃₂ ClFO ₅	466,98	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	4,34 (4)
	Corticosteron	50-22-6	(11 β)-11,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346,47	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	1,9 (1) 1,163 (3) 1,94 (5) 1,76 (6)

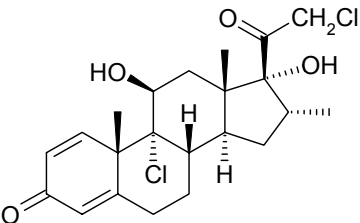
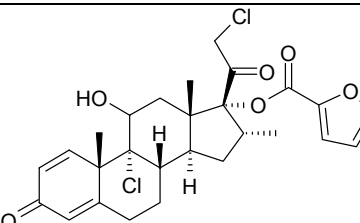
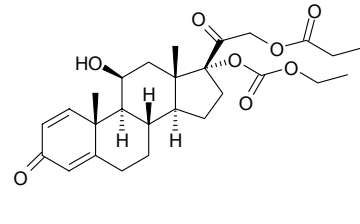
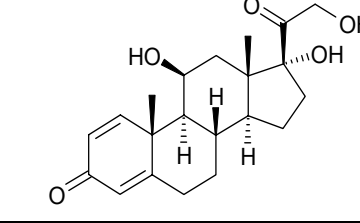
Substanzliste mit physikochemischen Angaben (Fortsetzung)

Struktur	Substanz (Handelsname)	CAS Nr.	Chemischer Name IUPAC-Bezeichnung	Summen- formel	MW [g/mol]	Steroidegruppe	Log P-Werte aus Literatur
	Cortison	53-06-5	17,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,11,20-trion	$C_{21}H_{28}O_5$	360,45	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	1,47 (5) 1,24 (6)
	Desonid	638-94-8	11 β , 21-Dihydroxy-16 α ,17-dimethylmethylenedioxy-1,4-pregnadien-3,20-dion	$C_{24}H_{32}O_6$	416,52	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	-
	Desoximetason	382-67-2	9-Fluor-11 β ,21-dihydroxy-16 α -methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion	$C_{22}H_{29}FO_4$	376,47	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	-
	Dexamethason	50-02-2	9-Fluor-11 β ,17,21-trihydroxy-16 α -methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion	$C_{22}H_{29}FO_5$	392,45	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	1,83 (5)

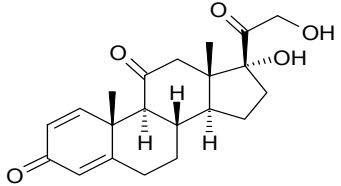
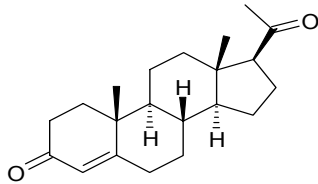
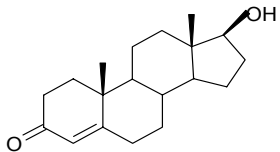
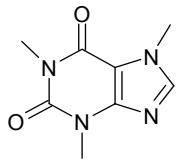
Substanzliste mit physikochemischen Angaben (Fortsetzung)

Struktur	Substanz (Handelsname)	CAS Nr.	Chemischer Name IUPAC-Bezeichnung	Summen- formel	MW [g/mol]	Steroidegruppe	Log P-Werte aus Literatur
	Estradiol	50-28-2	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,39	Steroidhormone: Sexual-Hormone: Estrogene	4,01 (5) 4,13 (6)
	Fusidinsäure	6990-06-3	16 β -Acetoxy-3 α ,11 α -dihydroxy-29-nor-5 α ,8 α ,9 β ,13 α ,14 β -dammara-17(20),24-dien-21-säure	C ₃₁ H ₄₈ O ₆	516,72	Steroid-Antibiotika	-
	Hydrocortison	50-23-7	11 β ,17,21-Trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362,47	Steroidhormone: Nebennierenrinden-Hormone: Glucocortikoide	1,5 (1) 0,537 (3) 1,64 (5) 1,43 (6)
	Methylprednisolon	83-43-2	11 β ,17,21-Trihydroxy-6 α -methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	374,46	Steroidhormone: Nebennierenrinden-Hormone: Glucocortikoide	2,2 (1) 1,642 (1)

Substanzliste mit physikochemischen Angaben (Fortsetzung)

Struktur	Substanz (Handelsname)	CAS Nr.	Chemischer Name IUPAC-Bezeichnung	Summen- formel	MW [g/mol]	Steroidegruppe	Log P-Werte aus Literatur
	Mometason	0105102-22-5	9,21-Dichlor-11b,17-dihydroxy-16α-methyl-1,4-pregna-dien-3,20-dion	C ₂₂ H ₂₈ Cl ₂ O ₄	427,37	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	3,58 (1)
	Mometason-furoat	83919-23-7	9,21-Dichlor-11β,17-dihydroxy-16α-methyl-1,4-pregna-dien-3,20-dion-17-(2-furoat)	C ₂₇ H ₃₀ Cl ₂ O ₆	521,44	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	3,69 (1)
	Prednicarbat	73771-04-7	11β,17,21-Trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion, 17α-ethylcarbonat, 21-propionat	C ₂₇ H ₃₆ O ₈	488,58	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	-
	Prednisolon	50-24-8	11β,17,21-Trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360,45	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	1,7 (1) 1,123 (3)

Substanzliste mit physikochemischen Angaben (Fortsetzung)

Struktur	Substanz (Handelsname)	CAS Nr.	Chemischer Name IUPAC-Bezeichnung	Summen- formel	MW [g/mol]	Steroidegruppe	Log P-Werte aus Literatur
	Prednison	53-03-2	17 α ,21-Dihydroxy-1,4-pregnen-3,11,20-trion	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	358,44	Steroidhormone: Nebennierenrinden- Hormone: Glucocortikoide	1,6 (1) 0,721 (3)
	Progesteron	57-83-0	4-Pregnen-3,20-dion	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,47	Steroidhormone: SexualHormone: Gestagene	3,9 (1) 3,8 (1) 3,87 (5)
	Testosteron	58-22-0	17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288,43	Steroidhormone: Sexual- Hormone: Androgene	3,3 (1) 3,219 (3) 3,32 (5) 3,48 (6)
	Koffein	58-08-2	1,3,7-Trimethyl-2,6(1H,3H)-purindion	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	kein Steroid, Analeptikum	-0,07 (2) -0,057 (3) -0,07 (5) -0,08 (6)

1) Internetangaben

2) Avdeef 2003

3) Testa et al. 2001

4) Poster: Pimecrolimus is less permeable than tacrolimus or corticosteroids, Bilich A. Aschauer H., Stuetz A., Novartis Research Institute, Vienna, Austria

5) Edetox: Chemikaliendatenbank (www.ncl.ac.uk/edetox)

6) Magnusson et al. 2004

Anhang 2**Wirkstärkeneinleitung und äquipotente Konzentrationsbereiche dermaler Glucocorticoiden**

Klasse	Wirkung	Corticoid	Konzentration [%]
I	schwach wirksam	Dexamethason	bis 0,050
		Dexamethasonisonicotinat	0,025
		Fluocinolonacetonid	0,0025
		Fluocortinbutylester	0,750
		Hydrocortison	bis 1,000
		Hydrocortisonacetat	bis 1,000
		Methylprednisolonacetat	0,250
		Prednisolon	bis 0,400
		Triamcinolonacetonid	bis 0,0125
II	mittelstark wirksam	Aclometasondipropionat	0,050
		Betamethasonvalerat	0,050
		Clobetasonbutyrat	0,050
		Desonid	0,100
		Desoxymethason	0,100
		Flumetasonpivalat	0,020
		Fluocinolonacetonid	bis 0,01
		Fluocortinbutyl	0,750
		Fluprednidenacetat	bis 0,100
		Hydrocortisonaceponat	0,100
		Hydrocortisonbuteprat	0,100
		Hydrocortisonbutyrat	0,100
		Methylprednisolonaceponat	0,100
		Prednicarbat	0,250
		Triamcinolonacetonid	0,025
III	stark wirksam	Amcinonid	0,1
		Beclometasondipropionat	0,025
		Betamethasonbenzoat	0,025
		Betamethasondipropionat	0,05
		Betamethasonvalerat	0,1
		Budesonid	0,025
		Desonid	0,05
		Desoximetason	0,25

Wirkstärkeneinleitung und äquipotente Konzentrationsbereiche dermaler Glucocorticoiden
(Fortsetzung)

Klasse	Wirkung	Corticoid	Konzentration [%]
III	stark wirksam	Diflorasondiacetat	0,05
		Diflucortolonvalerat	0,1
		Fluocinolonacetonid	0,025
		Fluocinonid	0,05
		Fluprednidenacetat	0,1
		Fluticasonpropionat	0,050
		Halcinonid	0,100
		Halometason	0,050
		Hydrocortisonbutyrat	0,1
		Methyprednisolonaceponat	0,1
		Mometasonfuroat	0,1
		Triamcinolonacetonid	0,1
IV	sehr stark wirksam	Clobetasolpropionat	0,050
		Diflucortolonvalerat	0,3
		Fluocinolonacetonid	0,2
		Halcinonid	0,1

Anhang 3**Handelspräparatliste****Betamethasonvalerat**Monopräparate:1. *BetaCreme Lichtenstein (Lichtenstein)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Chlorocresol 0,5 mg, Cetomacrogol, Cetylstearylalkohol, dickflüssiges Paraffin, weißes Vaseline, Natriumdihydrogenphosphat 2H₂O, Natriumhydroxid, gereinigtes Wasser.

2. *BetaSalbe Lichtenstein (Lichtenstein)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Dickflüssiges Paraffin, Wollwachs, weißes Vaseline.

3. *Betagen Creme (GALENpharma)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Phenoxyethanol 3,9 mg, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Propylenglycol, Dimeticon 20, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, Wasser.

4. *Betagen Lösung (GALENpharma)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: 2-Propanol 400 mg, Glycerol, Propylenglycol, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, Wasser.

5. *Betagen Lotion (GALENpharma)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Phenoxyethanol 4,2 mg, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Propylenglycol, Dimeticon 20, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, Wasser.

6. *Betagen Salbe (GALENpharma)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, mikrokristallines Paraffin, dickflüssiges Paraffin.

7. *Beta-Wolff Crème (Wolff)*
Zus.: 100 g enth.: Betamethasonvalerat 0,122 g (entspr. 0,1 g Betamethason).
Weit. Bestandteile: Benzylalkohol, Cetylstearylalkohol, Citronensäure H₂O-frei, Dimeticon (350), Glycerolmonostearat, Natriumcitrat 2H₂O, Natriumedetat, Macrogol-20-glycerolmonostearat, Propylenglycol, mittelkettige Triglyceride, weißes Vaseline, gereinigtes Wasser.
8. *Betnesol®-V crinale 0,1% Lösung (isopropylalkoholisch-wässrig) (GlaxoSmithKline)*
Zus.: 1 ml enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).
Weit. Bestandteile: Carbopol, Isopropylalkohol.
9. *Betnesol®-V Lotio 0,1% (GlaxoSmithKline)*
Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).
Weit. Bestandteile: Cetylstearylalkohol, Methyl-4-hydroxybenzoat, Xanthan Gum, Cetomacrogol 1000, dickfl. Paraffin, Glycerol, Isopropylalkohol, Natriumcitrat, Citronensäure 1H₂O, gereinigtes Wasser.
10. *Betnesol®-V Creme 0,1% (GlaxoSmithKline)*
Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).
Weit. Bestandteile: Chlorocresol, Cetomacrogol 1000, Cetylstearylalkohol, weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin.
11. *Betnesol®-V Salbe 0,1% (GlaxoSmithKline)*
Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).
Weit. Bestandteile: Dickflüssiges Paraffin, Weißes Vaseline.
12. *Celestan®-V Creme; -Salbe (essex pharma)*
Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg.
Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin, Creme zusätzlich: Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Chlorocresol, Phosphatpuffer, gereinigtes Wasser.
13. *Cordes® Beta Creme (Ichthyol)*
Zus.: 100 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).
Weit. Bestandteile: Grundlage: Cetylstearylalkohol, Chlorocresol, Macrogol-20-cetylstearylether, weißes Vaseline, Natriumhydroxid, dickflüssiges Paraffin, Natriumdihydrogenphosphat, gereinigtes Wasser.
14. *Cordes® Beta Salbe (Ichthyol)*
Zus.: 100 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).
Weit. Bestandteile: Grundl.: Sorbitanstearat, dickflüssiges Paraffin, weißes Vaseline.

15. *DEFLATOP® 0,1% Schaum (Fujisawa Deutschland)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg (0,1%) Betamethason).

Weit. Bestandteile: Hexadecan-1-ol, Stearylalkohol, Polysorbat 60, Ethanol 99,7%, Gereinigtes Wasser, Propylenglycol, Citronensäure, Kaliumcitrat, Butan/Propan/2-Methylpropan.

16. *Soderm Creme (Dermapharm)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Cetylstearylalkohol, Chlorocresol, Cetomacrogol 1000, weißes Vaseline, Natriumhydroxid, dickflüssiges Paraffin, Natriumdihydrogenphosphat, ger. Wasser.

17. *Soderm Lotio (Dermapharm)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Methyl-4-hydroxybenzoat, Cetomacrogol 1000, Cetylstearylalkohol, Macrogolmonostearat, dickfl. Paraffin, Glycerol, Isopropylalkohol, Citronensäure, gereinigtes Wasser.

18. *Soderm Salbe (Dermapharm)*

Zus.: 1 g enth.: Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: dickflüssiges Paraffin, Wollwachs, weißes Vaseline.

Kombipräparate:

19. *Fucicort® Creme (LEO)*

Zus.: 1 g enth.: Fusidinsäure $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 20,5 mg (entspr. 20 mg Fusidinsäure), Betamethasonvalerat 1,22 mg (entspr. 1 mg Betamethason).

Weit. Bestandteile: Chlorocresol 1 mg, Cetomacrogol 1000, Cetylstearylalkohol, Natriumdihydrogenphosphat $2\text{H}_2\text{O}$, dickflüssiges Paraffin, weißes Vaseline, Natriumhydroxid, gereinigtes Wasser.

20. *Sulmycin® mit Celestan®-V Creme; -Salbe (essex pharma)*

Zus.: 1 g enth.: Gentamicinsulfat 1,67 mg (entspr. 1 mg Gentamicin), Betamethasonvalerat 1,22 mg.

Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin, Creme zusätzlich: Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Chlorocresol, gereinigtes Wasser, Phosphatpuffer.

ClobetasolpropionatMonopräparate:

1. *Clobegalen® Creme (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.
Weit. Bestandteile: 2-Phenoxyethanol 3,6 mg, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Macrogolcetylstearylether, Propylenglycol, Dimeticon 20, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, gereinigtes Wasser
2. *Clobegalen® Lösung (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.
Weit. Bestandteile: 2-Propanol, Glycerol 85%, Propylenglycol, Citronensäure, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, gereinigtes Wasser.
3. *Clobegalen® Lotion (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.
Weit. Bestandteile: 2-Phenoxyethanol 4,2 mg, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Macrogolcetylstearylether, Propylenglycol, Dimeticon 20, Citronensäure 2H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, gereinigtes Wasser.
4. *Clobegalen® Salbe (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.
Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, Dehymuls K, mittelkettige Triglyceride, Hartparaffin, gebleichtes Wachs, dünnflüssiges Paraffin.
5. *Dermoxinale® Lösung (isopropylalkoholisch-wässrig) (GlaxSmithKline)*
Zus.: 1 g enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.
Weit. Bestandteile: Carbomer, Isopropylalkohol, Natriumhydroxid, gereinigtes Wasser.
6. *Karison® Creme (Dermapharm)*
Zus.: 1 g Creme enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.
Weit. Bestandteile: Methyl-4-hydroxybenzoat, Dinatriumedetat, weißes Vaseline, Stearylalkohol, dickfl. Paraffin, Sorbitansesquiöleat, Polysorbat 80, Glycerol, ger. Wasser.
7. *Karison® Crinale Lösung (Dermapharm)*
Zus.: 1 g enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.
Weit. Bestandteile: Dinatriumedetat, Polysorbat 80, Isopropylalkohol, ger. Wasser.

8. *Karison® Fettsalbe (Dermapharm)*

Zus.: 1 g Fettsalbe enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.

Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, Glycerolmonostearat, Sorbitansesquioleat, Propylenglycol.

9. *Karison® Salbe (Dermapharm)*

Zus.: 1 g Salbe enth.: Clobetasol-17-propionat 0,5 mg.

Weit. Bestandteile: Dinatriumedetat, weißes Vaseline, Stearylalkohol, dickfl. Paraffin, Sorbitansesquioleat, Polysorbat 80, ger. Wasser.

Hydrocortison

Monopräparate:

1. *Dermallerg-ratiopharm® Creme 1% (ratiopharm)*

Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 10 mg.

Weit. Bestandteile: Kaliumsorbat (E 202), selbstemulgierende Tri- und Partialglyceride, selbstemulgierende Salbengrundlage O/W, Cetylalkohol, weiße Vaseline, Glycerol, Citronensäure (E 330), Natriumcitrat (E 331), BHT (E 321), Palmitoylascorbinsäure (E 304), gereinigtes Wasser.

2. *DermoPosterisan® Salbe (Kade)*

Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 2,5 mg.

Weit. Bestandteile: Phenol, gelbes Vaseline, Wollwachs, gereinigtes Wasser.

3. *Hydrocortison 10 mg JENAPHARM® Tabletten (Jenapharm)*

Zus.: 1 Tbl. enth.: Hydrocortison 10 mg.

Weit. Bestandteile: Lactose, Talkum, Natriumcarboxymethylstärke, Kartoffelstärke, Gelatine, Magnesiumstearat.

4. *Hydrocortison GALEN® 10 mg Tabletten (GALENpharma)*

Zus.: 1 Tbl. enth.: Hydrocortison 10 mg.

Weit. Bestandteile: Lactose 1H₂O, Cellulosepulver, Talkum, Croscarmellose-Natrium, Crospovidon, Magnesiumstearat.

5. *Hydrocortison Hoechst® Tabletten (TEOFARMA)*

Zus.: 1 Tbl. enth.: Hydrocortison 10 mg.

Weit. Bestandteile: Lactose 1H₂O, Maisstärke, Talkum, Magnesiumstearat, Siliciumdioxid.

6. *Hydrocortison Hoechst® Infusionslösungskonzentrat (TEOFARMA)*
Zus.: 1 ml enth.: Hydrocortison 5 mg.
Weit. Bestandteile: Ethanol 50 Vol.-%, Wasser f. Inj.-zwecke.
7. *Hydrocutan Salbe mild (Dermapharm)*
Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 1 mg.
Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, dickflüssiges Paraffin, Stearylalkohol, Sorbitansesquioleat, Polysorbat 80, Dinatriumedetat, ger. Wasser.
8. *Hydrocutan Tabletten 10 mg (Dermapharm)*
Zus.: 1 Tbl. enth.: Hydrocortison 10 mg.
Weit. Bestandteile: Lactose, Talkum, Kartoffelstärke, Gelatine, Natriumcarboxymethylstärke, Magnesiumstearat.
9. *Hydroderm HC 0,5% Creme (Karrer)*
Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 5 mg.
Weit. Bestandteile: Düninflüssiges Paraffin, Cetylstearylalkohol, weißes Vaseline, Cetomacrogol 1000, emulgierendes Wachs, Propylenglycol, Phenoxyethanol, Kaliumsorbat, Sorbinsäure, Natriumedetat, gereinigtes Wasser.
10. *Hydrogalen® Creme (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 10 mg.
Weit. Bestandteile: Phenoxyethanol 3,6 mg, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Propylenglycol, Dimeticon 20, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, gereinigtes Wasser.
11. *Hydrogalen® Lösung (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 10 mg.
Weit. Bestandteile: Isopropylalkohol, Glycerol, Propylenglycol, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, gereinigtes Wasser.
12. *Hydrogalen® Lotion (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 10 mg.
Weit. Bestandteile: Phenoxyethanol 4,2 mg, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Propylenglycol, Dimeticon 20, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, gereinigtes Wasser.
13. *Hydrogalen® Salbe (GALENpharma)*
Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 10 mg.
Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, Decyloleat, Dicocoylpentaerythrityldistearylcitrat, Sorbitansesquioleat, gebleichtes Wachs,

Aluminiumstearat, mikrokristallines Paraffin, dickflüssiges Paraffin, Hartparaffin, mittelkettige Triglyceride, dünnflüssiges Paraffin.

14. *Hydro-Wolff® 0,5%/-1% Creme (Wolff)*

Zus.: 100 g enth.: Hydrocortison 0,5 g/1 g.

Weit. Bestandteile: Benzylalkohol, Cetylstearylalkohol, Citronensäure H₂O-frei, Dimeticon (350), Glycerolmonostearat, Macrogolglycerolstearat, Dinatriumedetat, Natriumcitrat 2H₂O, Propylenglycol, mittelkettige Triglyceride, weißes Vaseline, gereinigtes Wasser.

15. *Hydro-Wolff® Lotio (Wolff)*

Zus.: 100 g enth.: Hydrocortison 0,5 g.

Weit. Bestandteile: Benzylalkohol, Citronensäure H₂O-frei, Macrogolpalmitostearat, Dinatriumedetat, Natriumcitrat 2H₂O, dickfl. Paraffin, Polyoxethylierte Glyceride, Macrogol-6-32-stearat, Propylenglycol, Stearinsäure, gereinigtes Wasser.

16. *Remederm HC Creme Widmer (Widmer)*

Zus.: 100 g enth.: Hydrocortison 1 g.

Weit. Bestandteile: Dexpanthenol, Retinolpalmitat, Tocopherolacetat, 1, 3-Distearylhydrogencitrat, Pentaerythrit-di-kokosfettsäureester, Glycerolmonooleat, Aluminiumdistearat, Propylenglycol, Sorbitansesquioleat, gebleichtes Wachs, Hartparaffin, weißes Vaseline, dünnflüssiges Paraffin, Polyethylenwachs, Glycerolmonostearat, Isopropylmyristat, Ölsäuredecylester, Dibutyladipat, 1,3-Butandiol, Sorbitol-Lsg. 70%, Milchsäure, BHT, Butylhydroxyanisol, Edetinsäure, Phenoxyethanol, Imidazolidinylharnstoff, gereinigtes Wasser.

17. *Sanatison® Mono 1/3%/-1% Salbe (Taurus Pharma)*

Zus.: 1 g 1/3%/1% enth.: Hydrocortison 3,3 mg/10 mg.

Weit. Bestandteile: Sorbinsäure, α -Tocopherol, Glycerol 85%, Glycerol(mono,di)isostearat, Hexyllaurat, Magnesiumsulfat 7H₂O, dünnflüssiges Paraffin, Vitaminöl, THG-Glycerinfettsäureester, THG-Wachs, weißes Vaseline, ger. Wasser.

18. *Systral® Hydrocort Lotion (Viatrix)*

Zus.: 1 g enth.: Hydrocortison 2,5 mg.

Weit. Bestandteile: Phenoxyethanol, Decyloleat, Cetylstearylalkohol, Cetomacrogol 1000, Propylenglycol, Dimeticon 20, Citronensäure H₂O-frei, Natriummonohydrogenphosphat 2H₂O, gereinigtes Wasser.

Kombipräparate:19. *Baycuten® HC Creme (Bayer Vital)*

Zus.: 100 g enth.: Clotrimazol 1 g, Hydrocortison 1 g.

Weit. Bestandteile: Benzylalkohol, Cetylstearylalkohol, gereinigtes Wasser, Tris[alkyl(C16-C18)macrogol-4]phosphat, mittelkettige Triglyceride.

20. *FARCO-TRIL® 3 g Gel zur Instillation (Farco-Pharma)*

Zus.: 3 g enth.: Oxytetracyclin-Hemicalcium 16,5 mg, Polymyxin-B-sulfat 3,81 mg (entspr. 30.000 I.E. Polymyxin B), Hydrocortison 30 mg.

Weit. Bestandteile: Agar, Cetylpyridiniumchlorid, Milchsäuremonoethanolamid, Magnesiumformaldehydsulfoxylat, Hypromellose, 2-Aminoethanol, Natriummetabisulfit, Methyl-4-hydroxybenzoat, Propyl-4-hydroxybenzoat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Wasser gereinigt.

21. *Hydrodexan® Creme (Hermal)*

Zus.: 1 g Creme enth.: Hydrocortison 10 mg, Harnstoff 100 mg.

Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, Maisstärke, Isopropylmyristat, Sorbitanlaurat, Sorbitol Lsg. 70% (kristallisierend) Poly(oxyethylen)-25-hydriertes Rizinusöl, gereinigtes Wasser.

22. *Hydrodexan® Salbe (Hermal)*

Zus.: 1 g Salbe enth.: Hydrocortison 10 mg, Harnstoff 100 mg.

Weit. Bestandteile: Weißes Vaseline, Maisstärke, Octyldodecanol, Glyceroltridocosanoat, Palmitinsäure, Sorbitanlaurat, Macrogolricinoleat 25.

23. *Ichthocortin® fett Salbe (Ichthyol)*

Zus.: 100 g enth.: Hydrocortison 0,4 g, Natriumbituminosulfonat (Ichthyol® Natrium), hell 3 g.

Weit. Bestandteile: Propylenglycol, Wollwachs, gelbes Vaseline.

24. *Pigmanorm Creme Widmer (Widmer)*

Zus.: 100 g enth.: Hydrochinon 5 g, Tretinoin 0,1 g, Hydrocortison 1 g.

Weit. Bestandteile: α -Dodecyl- ω -hydroxypolymacrogol-4, Isopropylmyristat, Cetylstearylalkohol, Glycerolmonostearat, Hartparaffin, Macrogol, Ascorbinsäure, dünnflüssiges Paraffin, Natrium Cetearyl Sulfat, Wasser.

Mometasonfuroat

Monopräparate:

1. *Asmanex® Twisthaler® 200 Mikrogramm/-400 Mikrogramm Pulver zur Inhalation (essex pharma)*

Zus.: 1 Dosis enth.: Mometasonfuroat 200 µg/400 µg.

Weit. Bestandteile: Lactose.

2. *Ecural® Fettcreme (essex pharma)*

Zus.: 1 g enth.: Mometasonfuroat 1 mg.

Weit. Bestandteile: 2-Methylpentan-2,4-diol, gereinigtes Wasser, Propylenglycolmonopalmitostearat, Cetomacrogol 1000, Poly-{O-[hydrogen-(oct-1-en-1-yl)succinyl]stärke}, Aluminiumsalz, Titandioxid, gebleichtes Wachs, weißes Vaseline, Phosphorsäure 10%.

3. *Ecural® Lösung (essex pharma)*

Zus.: 1 g enth.: Mometasonfuroat 1 mg.

Weit. Bestandteile: Propylenglycol, gereinigtes Wasser, 2-Propanol, Natriumdihydrogenphosphat 1H₂O, Hypromellose, Phosphorsäure 10%.

4. *Ecural® Salbe (essex pharma)*

Zus.: 1 g enth.: Mometasonfuroat 1 mg.

Weit. Bestandteile: 2-Methylpentan-2,4-diol, gereinigtes Wasser, Propylenglycolmonopalmitostearat, gebleichtes Wachs, weißes Vaseline, Phosphorsäure 10%.

5. *Nasonex® 50 µg/Sprühstoß Nasenspray, Suspension (essex pharma)*

Zus.: 100 mg (= 1 Sprühstoß) enth.: Mometason-17-(2-furoat) 1H₂O 50 µg.

Weit. Bestandteile: Mikrokristalline Cellulose, Carmellose-Natrium, Glycerol, Natriumcitrat 2H₂O, Citronensäure 1H₂O, Polysorbat 80, Benzalkoniumchlorid-Lsg., Phenethylalkohol, gereinigtes Wasser.

Testosteron

Monopräparate:

1. *Androderm® 2,5 mg Transdermales Pflaster zum Aufkleben auf die Haut (AstraZeneca / Promed)*

Zus.: 1 transdermales Pflaster enth.: Testosteron 12,2 mg. Die durchschnittliche Wirkstofffreigabe über d. Haut beträgt ca. 2,5 mg Testosteron/transdermalem Pflaster/24 h.

Weit. Bestandteile: Ethanol 95%, gereinigtes Wasser, Glycerol, Glycerolmonooleat, Methylododecanoat, Natriumhydroxid, Carbomer 1342, Aluminium, Polyethylen, Polyester, Poly(ethylen-co-vinylacetat), siliconbeschichtetes Polyester, Polyesterurethan, Polyester metallisierend, Iomomer, 2-Komponenten Farbe.

2. *Androtop® Gel 25 mg/-50 mg Gel im Beutel (Kade/Besins / Solvay Arzneimittel)*

Zus.: 1 Btl. (2,5 g/5 g) enth.: Testosteron 25 mg/50 mg.

Weit. Bestandteile: Carbomer 980, Ethanol 96%, Isopropylmyristat, Natriumhydroxid, gereinigtes Wasser.

3. *Testogel® 25 mg/-50 mg Gel im Beutel (Jenapharm)*

Zus.: 1 Btl. (2,5 g/5 g) enth.: Testosteron 25 mg/50 mg.

Weit. Bestandteile: Carbomer 980, Ethanol 96%, Isopropylmyristol, Natriumhydroxid, Wasser.

Koffein

Kosmetika und Pflegemittel:

1. *Crealite, Firma Creaderm*

Zus.: 1g Creme enth.: 20 mg Coffein.

Weit. Bestandteile: Aqua, Glyceryl Stearate, Caprylic/Capric Triglyceride, PEG-100 Stearate, Sodium Benzoate, Cyclomethicone, Cetyl Alcohol, Stearyl Alcohol, Dimeticone, Hydrogenated Lecithin, Glycolic Acid, Benzyl Alcohol, Sodium Hydroxide, Acrylates / C10-30, Alcyl Acrylate Crosspolymer, Triethanolamin, Imidazolidinyl Urea, Methylparaben, Propylparaben, Vanilla Oil, Lemon Oil.

2. *Progressif Carita, Creme Lift, Raffermissante Corps*

3. *Phyto Sculptural-Anti-Cellulite, Sisley*

4. *Vichy Liposyn Figurpflege Gel, Creme-Gel, Vichy Pharma Kosmetik*

Literaturverzeichnis

- Akomeah F., Nazir T., Martin G.P., Brown M.B., Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21, 2004, 337-345
- Alberti I., Grenier A., Kraus H., Carrara D.N., Pharmaceutical development and clinical effectiveness of a novel gel technology for transdermal drug delivery, *Expert Opinion on Drug Delivery* 2 (5), 2005, 935-950
- Allen A.E., Gupta V.D., Stability of Hydrocortisone in Polyethylene Glycol Ointment Base, *Journal of Pharmaceutical Science* 63 (1), 1974, 107-109
- APV, Haltbarkeit und Haltbarkeitsprüfung von Arzneimitteln, APV-Richtlinie mit Kommentar, *Pharmazeutische Industrie* 47 (6), 1985
- Arellano A., Santoyo S., Martin C., Ygartua P., Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels, *European Journal of Pharmaceutical Science* 7, 1998, 129-135
- Arens-Corell M., Baby Hautpflege, *Skin Care Forum*, Ausgabe 24, 2001
- Asbill C., Kim N., El-Kattan A., Creek K., Wertz P., Michniak B., Evaluation of a human Bio-Engineered Skin Equivalent for Drug Permeation Studies, *Pharmaceutical Research* 17 (9), 2000, 1092-1097
- Auner B.G., Valenta C., Influence of phloretin on the skin permeation of lidocaine from semisolid preparations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57, 2004, 307-312
- Avdeef A. und Testa B., Physicochemical profiling in drug research: a brief survey of the state-of-the-art of experimental techniques, *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 2002, 1681-1689
- Avdeef A., Absorption and Drug Development, John Wiley & Sons, 2003
- Ayala-Bravo H.A., Quintanar-Guerrero D., Naik A., Kalia Y.N., Cornejo-Bravo J.M., Ganem-Quintanar A., Effects of Sucrose Oleate and Sucrose Laureate on in Vivo Human Stratum Corneum Permeability, *Pharmaceutical Research*, 20 (8), 2003, 1267-1273
- Balbach S., Korn C., Pharmaceutical evaluation of early development candidates "the 100 mg-approach", *International Journal of Pharmaceutics* 275, 2004, 1-12

- Banerjee S., Yalkowsky S.H., Valvani S.C., Water Solubility and Octanol/Water Partition Coefficients of Organics. Limitations of the Solubility-Partition Coefficient Correlation, *Environmental Science & Technology* 14, 1980, 1227-1229
- Barbato F., Capello B., Miro A., La Rotonda M., Quaglia F., Chromatographic indexes on immobilized artificial membranes for the prediction of transdermal transport of drugs, *Il Farmaco* 53, 1998, 655-661
- Barbato F., La Rotonda M., Quaglia F., Interactions of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs with Phospholipids: Comparison between Octanol/Buffer Partition Coefficients and Chromatographic Indexes on Immobilized Artificial Membranes, *Journal of Pharmaceuticals Sciences* 86 (2), 1997, 225-229
- Barry B.W., Bennett S.L., Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39, 1987, 535-546
- Barry B.W., *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*, Marcel Dekker, INC., 1983, 351-407
- Barry B.W., Mode of action of penetration enhancers in human skin, *Journal of Controlled Release* 6, 1987, 85-97
- Barry B.W., Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14, 2001, 101-114
- Barton P., Davis A., McCarthy D. J., Webborn P.J.H., Drug-Phospholipid Interactions 2. Predicting the sites of Drug Distribution using n-Octanol/Water and Membrane/Water Distribution Coefficients, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86, 1997, 1034-1039
- Bauer K.H., Frömming K.-H., Führer C., *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, Stuttgart, 1999, 38-44
- Beigi F., Gottschalk I., Lagerquist Hägglund C., Haneskog L., Brekkan E., Zhang Y., Österberg T., Lundahl P., Immobilized liposome and biomembrane partitioning chromatography of drugs for prediction of drug transport, *International Journal of Pharmaceutics* 164, 1998, 129-137
- Bernal C., Pidgeon C., Affinity purification of phospholipase A2 on immobilized artificial membranes containing and lacking the glycerol backbone, *Journal of Chromatography A* 731, 1996, 139-151
- Bertin C., Zunino H., Pittel J.C., A double-blind evaluation of the activity of an anti-cellulite product containing retinol, caffeine and ruscogenine by a combination of several noninvasive methods, *Journal of Cosmetic Science* 52, 2001, 199-210

- Bevan C.D., Lloyd R.S., A High-Throughput Screening Method for the Determination of Aqueous Drug Solubility Using Laser Nephelometry in Microtiter Plates, *Analytical Chemistry*, 72 (8), 2000, 1781-1787
- Billich A., Aschauer H., Aszodi A., Stuetz A., Percutaneous absorption of drugs used in atopic eczema: pimecrolimus permeates less through skin than corticosteroids and tacrolimus, *International Journal of Pharmaceutics* 269, 2004, 29-35
- Bock U., Schmitz S., Haltner E., In vitro systems to characterize dermal permeation and penetration, *The Essential Stratum Corneum*, Martin Dunitz Ltd., 2002, 157-160
- Bohets H., Annaert P., Mannens G., van Beijsterveldt L., Anciaux K., Verboven P., Meuldermans W., Lavrijsen K., Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1, 2001, 367-383
- Bonina F.P., Carelli V., Di Colo G., Montenegro L., Nannipieri E., Vehicle effects on in vitro skin permeation of and stratum corneum affinity for model drugs caffeine and testosterone, *International Journal of Pharmaceutics* 100, 1993, 41-47
- Brazzini B., Pimpinelli N., New and established topical corticosteroids in dermatology: clinical pharmacology and therapeutic use, *American Journal of Clinical Dermatology* 3 (1), 2002, 47-58
- Brinkmann I., Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeation von Hydrocortison und Prednicarbat durch excidiertes humanes Stratum corneum und ein organotypisches Hautkonstrukt, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Branschweig, 2006
- Bucher K., Bucher K.E., Walz D., Irritant actions of unphysiological pH values. A controlled procedure to test for topical irritancy, *Agents and Actions* 9 (1), 1979, 124-132
- Budhathoki U., Thapa P., Effect of chemical enhancers on in vitro release of salbutamol sulphate from transdermal patches, *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 1 (1), 2005, 1-8
- Bundgaard H., Hansen J., Studies on the stability of corticosteroids VI. Kinetics of the rearrangement of betamethasone-17-valerate to the 21-valerate ester in aqueous solution, *International Journal of Pharmaceutics* 7, 1981, 197-203
- Cazares-Delgadillo J., Naik A., Kalia Y.N., Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A., Skin permeation enhancement by sucrose esters: A pH-dependent phenomenon, *International Journal of Pharmaceutics* 297, 2005, 204-212

- Csoka G., Marton S., Zelko R., Otomo N., Antal I., Application of sucrose fatty acids esters in transdermal therapeutics systems, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 65 (2), 2007, 233-237
- Csoka I., Csanyi E., Zapantis G., Nagy E., Feher-Kiss A., Horvath G., Blazso G., Eros I., In vitro and in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies, *International Journal of Pharmaceutics* 291, 2005, 11-19
- DAB, Deutsches Arzneibuch, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn, 2004
- DAC 1999/NRF, Deutscher Arzneimittelcodex 16. Ergänzung 1999
- Daniels R., Strategien zur Verbesserung der Hautpenetration, *Skin Care Forum*, Ausgabe 37, 2004
- Dias M., Farinha A., Faustino E., Hadgraft J., Pais J., Toscano C., Topical delivery of caffeine from some commercial formulations, *International Journal of Pharmaceutics* 182, 1999, 41-47
- Dreher F., Fouchard F., Patouillet C., Andrian M., Simonnet J.T., Benech-Kiefer F., Comparison of Cutaneous Bioavailability of Cosmetic Preparations Containing Caffeine or α -Tocopherol Applied on Human Skin Models or Human skin ex vivo at Finite Doses, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 15, 2002, 40-58
- EA, Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe, Grundwerk 2002, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH Eschborn
- El-Kattan A.F., Asbill Ch.S., Kim N., Michniak B.B. , The effect of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities, *International Journal of Pharmaceutics* 215, 2001, 229-240
- El-Kattan A.F., Asbill Ch.S., Michniak B.B., The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in HPMC gel systems, *International Journal of Pharmaceutics* 198, 2000, 179-189
- Faassen F., Kelder J., Lenders J., Onderwater R., Vromans H., Physicochemical Properties and Transport of Steroids across Caco-2 Cells, *Pharmaceutical Research* 20 (2), 2003, 177-186
- Faergemann J., Wahlstrand B., Hedner T., Johnsson J., Neubert R.H.H., Nyström L., Maibach H., Pentane-1,5-diol as a percutaneous absorption enhancer, *Archives of Dermatological Research* 297, 2005, 261-265

- Fang J.-Y., Fang Ch.-L., Sung K.C., Chen H.-Y., Effect of low frequency ultrasound on the in vitro percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate, *International Journal of Pharmaceutics* 191, 1999, 33-42
- FDA Guidance for Industry, Q1A, Stability testing of New Drug Substances and Products, U.S. Department of Health and Human Services, 2001
- Femenia-Font A., Balaguer-Fernandez C., Merino V., Rodilla V., Lopez-Castellano A., Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61, 2005, 50-55
- Ferguson J., Kembrowski Z., *Reologia stosowana plynów (Applied Fluid Rheology)*, Lodz, 1995
- Fitzpatrick D., Corish J., Hayes B., Modelling skin permeability in risk assessment –the future, *Chemosphere* 55, 2004, 1309-1314
- Florey K., Analytical profiles of drug substances, The American Pharmaceutical Association, 1983, Vol. 12, 277-324
- Foldvari M., Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design, *Pharmaceutical Science & Technology Today* 3 (12), 2000, 417-425
- Franke U.J., Quantitative Analyse von Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen am Beispiel von Neuroleptika und Calcium-Kanal-Blockern, Dissertation, Halle (Saale), 2000
- Franz T.J., Lehman P.A., Feldman S.R., Spellman M.C., Bioavailability of Clobetasol Propionate in Different Vehicles, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 16, 2003, 212-216
- Gallagher S.J., Trotter L., Heard Ch.M., Ketoprofen: release from, permeation across and rheology of simple gel formulations that simulate increasing dryness, *International Journal of Pharmaceutics* 268, 2003, 37-45
- Ganem-Quintanar A., Quintanar-Guerrero A., Falson-Rieg F., Buri P., Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose acid esters as absorption enhancer, *International Journal of Pharmaceutics* 173, 1998b, 203-210
- GD Gesellschaft für Dermopharmazie, Wirkstoffdossiers für externe dermatologische Rezepturen, 2005, www.gd-online.de
- Ghafourian T., Zandasrar P., Hamishekar H., Nokchodchi A., The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: a QSAR study, *Journal of Controlled Release* 99, 2004, 113-125

- Gorukanti S.R., Li L., Kim K.H., Transdermal delivery of antiparkinsonian agent, benztropine. I. Effect of vehicles on skin permeation, *International Journal of Pharmaceutics* 192, 1999, 159-172
- Guidance for Industry (Draft) 1722; SUPAC-SS: Nonsterile Semisolid Dosage Forms, December 1998
- Guidance for Industry; SUPAC-SS 1447: Nonsterile Semisolid Dosage Forms, Mai 1997
- Gupta V.D., Effect of Vehicles and Other Active Ingredients on Stability of Hydrocortisone, *Journal of Pharmaceutical Science* 67 (3), 1978, 299-302
- Gwak H.S., Kim S.U., Chun I.K., Effect of Vehicles and Enhancers on the In Vitro Permeation of Melatonin through Hairless Mouse Skin, *Archives of Pharmaceutical Research* 25 (3), 2002, 392-396
- Gysler A., Kleuser B., Sippl W., Lange K., Korting H.K., Hölting H.-D., Schäfer-Korting M., Skin Penetration and Metabolism of Topical Glucocorticoids in Reconstructed Epidermis and in Excised Human Skin, *Pharmaceutical Research* 16 (9), 1999a, 1386-1391
- Gysler A., Königsmann U., Schäfer-Korting M., Dreidimensionale Hautmodelle zur Erfassung der perkutanen Resorption, *ALTEX* 16 (2), 1999b, 67-72
- Haberland A., Schreiber S., Santos Maia C., Rübelke M.K., Schaller M., Korting H.C., Kleuser B., Schimke I., Schäfer-Korting M., The impact of skin viability on drug metabolism and permeation – BSA toxicity on primary keratinocytes, *Toxicology in vitro* 20, 2006, 347-354
- Hansen J., Bundgaard H., Studies on the stability of corticosteroids V. The degradation pattern of hydrocortisone in aqueous solution, *International Journal of Pharmaceutics* 6, 1980, 307-319
- Heard C.M., Johnson S., Moss G., Thomas C.P., In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia Cupana*, *International Journal of Pharmaceutics* 317, 2006, 26-31
- Heard C.M., Kung D., Thomas C.P., Skin penetration enhancement of mefenamic acid by ethanol and 1,8-cineole can be explained by the ‘pull’ effect, *International Journal of Pharmaceutics* 321 (1), 2006, 167-170
- Higuchi T., Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions, *Journal of Pharmaceutical Science* 50, 1961, 874-881

- ICH, International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Stability testing of new drug substances and products, ICH steering committee 1993
- Ikeda H., Chiba K., Kanou A., Hirayama N., Prediction of Solubility of Drugs by Conductor-Like Screening Model for Real Solvents, *Chemical & pharmaceutical bulletin* 53 (2), 2005, 253-255
- Johnson M.E., Mitragotri S., Patel A., Blankschtein D., Langer R., Synergistic Effects of Chemical Enhancers and Therapeutic Ultrasound on Transdermal Drug Delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (7), 1996, 670-679
- Kadir R., Stempler D., Liron Z., Cohen S., Delivery of theophylline into excised human skin from alkanoic acid solutions: a 'push-pull' mechanism, *Journal of Pharmaceutical Science* 76 (10), 1987, 774-779
- Kaliszan R., Nasal A., Bucinski A., Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column: relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity, *European Journal of Medicinal Chemistry* 29, 1994, 163-170
- Kandarova H., Liebsch M., Gerner I., Schmidt E., Genschow E., Traue D., Spielmann H., EpiDerm skin irritation test protocol- Assessment of the performance of the optimised test, *Alternatives to Laboratory Animals* 33 (4), 2005, 351-367
- Kandarova H., Liebsch M., Spielmann H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N., Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., Rosdy M., Assesment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431, *Toxicology in Vitro* 20, 2006, 547-559
- Karande P., Jain A., Mitragotri S., Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening, *Nature biotechnology* 22 (2), 2004, 192-197
- Keipert S., Schulz G., Mikroemulsionen auf Saccharoseesterbasis, Teil I: In vitro-Charakterisierung, *Pharmazie* 49, 1994, 195-197
- Kerns E.H., High Throughput Physicochemical Profiling for Drug Discovery, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (11), 2001, 1838-1858
- Kitamura K., Omran A.A., Nagata C., Kamijima Y., Tanaka R., Takegami S., Kitade T., Effects of Inorganic Ions on the Binding of Triflupromazine and Chlorpromazine to Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Methods, *Chemical & pharmaceutical bulletin* 54 (7), 2006, 972-976

- Kogan A., Garti N., Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles, *Advances in Colloid and Interface Science* 123-126, 2006, 369-385
- Krause S.A., Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneistoffen, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2001
- Lange K., Gysler A., Bader M., Kleuser B., Korting H.K., Schäfer-Korting M., Prednicarbate Versus Conventional Topical Glucocorticoids: Pharmacodynamic Characterization In Vitro, *Pharmaceutical Research* 14 (12), 1997, 1744-1749
- Larrucea E., Arellano A., Santoyo S., Ygartua P., Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52, 2001, 113-119
- Leichtnam M.-L., Rolland H., Wüthrich P., Guy R.H., Identification of penetration enhancers for testosterone transdermal delivery form spray formulations, *Journal of Controlled Release* 113, 2006, 57-62
- Levang A.K., Zhao K., Singh J., Effect of ethanol/propylene glycol on the in vitro percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and macroscopic barrier properties of the skin, *International Journal of Pharmaceutics* 181, 1999, 255-263
- Lieken J., Einfluss von hydrophilen und lipophilen Vehikeln auf die Wirkstoffpenetration durch die Haut, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2003
- Lipinski C.A., Physicochemical properties and the discovery of orally active drugs: technical and people issues, *Molecular Informatics: Confronting Complexity*, Bozen, Italy, 2002, 1-20
- Liu H., Li S., Wang Y., Yao H., Zhang Y., Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of cyclosporin A, *International Journal of Pharmaceutics* 311, 2006, 182-186
- Loth H., Holla-Benninger A., Hailer M., Untersuchungen der Arzneistoffliberation aus Salben, *Die Pharmazeutische Industrie* 41, 1979, 205-211
- Loth H., Vehicular influence on transdermal drug penetration, *International Journal of Pharmaceutics* 68, 1991, 1-10
- Maas J., Kamm W., Hauck G., An integrated early formulation strategy – From hit evaluation to preclinical candidate profile, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66 (1), 2007, 1-10
- Magnusson B., Anissimov Y.G., Cross S.E., Roberts M.S., Molecular Size as the Main Determinant of Solute Maximum Flux Across the Skin, *Journal of Investigative Dermatology* 122 (4), 2004, 993-999

- Magnusson B.M., Walters K.A., Roberts M.S., Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement, *Advanced Drug Delivery Reviews* 50 (3), 2001, 205-227
- Malzfeldt E., Lehmann P., Goerz G., Lippold B.C., Influence of drug solubility in the vehicle on clinical efficacy of ointments, *Archives of Dermatological Research* 281, 1989, 193-197
- Martindale, *The Extra Pharmacopoeia* 31, London Royal Pharmaceutical Society 1996
- Mitragotri S., Modelling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways, *Journal of Controlled Release* 86, 2003, 69-92
- Mitriaiikina S., Müller-Goymann C.C., Betamethasone-17-valerate (BM-17-V) permeation through excised human stratum corneum from different topical formulations and their dilutions, Postersession, 5th Worldmeeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva, 2006
- Mitsubitshi Kagaku Foods Corporation, Japan, Ryoto® Sugar Ester Technical Information, Nonionic surfacant/Sucrose fatty acid ester/ Food additive 2003
- Monti D., Giannelli R., Chetoni P., Burgalassi S., Comparison of the effect of ultrasound and of chemiacle enhancers on transdermal permeation of caffeine and morphine through hairless mouse skin in vitro, *International Journal of Pharmaceutics* 229, 2001, 131-137
- Moss G.P., Dearden J.C., Patel H., Cronin M.T.D., Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption, *Toxicology in Vitro* 16, 2002, 299-317
- Mueller B., Anissimov Y.G., Roberts M.S., Unexpected Clobetasol Propionate Profile in Human Stratum Corneum After Topical Application in Vitro, *Pharmaceutical Research* 20 (11), 2003, 1835-1837
- Mukherjee B., Kanupriya, Mahapatra S., Das S., Patra B., Sorbitan Monolaurate 20 as a Potential Skin Permeation Enhancer in Transdermal Patches, *The Journal of Applied Research* 5 (1), 2005, 96-108
- Müller-Goymann C.C., Alberg U., Modified water containing hydrophilic ointment with suspended hydrocortisone-21-acetate – the influence of the microstructure of the cream on the in vitro drug release and in vitro percutaneous penetration, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 47, 1999, 139-143
- Müller-Goymann C.C., Refai H., Tücken im Apothekenlabor, *Pharmazeutische Zeitung* 145 (37), 2000, 11-16

- Mura P., Faucci M.T., Bramanti G., Corti P., Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations, *European Journal of Pharmaceutical Science* 9, 2000, 365-372
- Murahata R.I., Toton-Quinn R., Finkey M.B., Effect of pH on the production of irritation in a chamber irritation test, *Journal of the American Academy of Dermatology* 18 (1 Pt 1), 1988, 62-66
- Nasal A., Sznitowska M., Bucinski A., Kaliszan R., Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relation to bioactivity, *Journal of Chromatography A*, 692, 1995, 83-89
- Netzlaff F., Kaca M., Bock U., Haltner-Ukomadu E., Meiers P., Lehr C.-M., Schaefer U.F., Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin preparations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66 (1), 2007, 127-134
- Netzlaff F., Kostka K.H., Lehr C.-M., Schaefer U.F., TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63 (1), 2006 b, 44-50
- Netzlaff F., Lehr C.-M., Wertz P.W., Schaefer U.F., The human epidermis models Episkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 2005, 167-178
- Neues Rezeptur-Formularium, Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH 2006, www.dac-nrf.de
- Nicoli S., Colombo P., Santi P., Release and Permeation Kinetics of Caffeine From Bioadhesive Transdermal Films, *AAPS Journal* 7 (1), 2005, E218-E223
- Niedorf F., Schmidt E., Kietzmann M., Automated, accurate and reproducible determination of steady-state permeation parameters in percutaneous permeation data, *Alternatives to Laboratory Animals* (eingereicht)
- OECD, Guidance document for the conduct of skin absorption studies, OECD series on testing and assessment, Number 28, March 2004
- OECD, Guideline for testing of chemicals, 105 Water solubility, 1995
- OECD, Guideline for the testing of chemicals, Skin absorption: in vitro method, Test Guideline 428, 2004b

- Oh H.-J., Oh Y.-K., Kim. C.-K., Effects of vehicles and enhancers on transdermal delivery of melatonin, *International Journal of Pharmaceutics* 212, 2001, 63-71
- Okamoto H., Sakai T., Danjo K., Effects of Sucrose Fatty Acid Esters on Transdermal Permeation of Lidocaine and Ketoprofen, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28 (9), 2005, 1689-1694
- Patent Application 20050238677, 10/27/05, Multi-lammellar liquid crystal emulsion system
- Ph. Eur., European Pharmacopoeia, 5. Ausgabe, Grundwerk 2005
- Pitman I.H., Rostas S.J., A comparison of frozen and reconstituted cattle and human skin as barriers to drug penetration, *Journal of Pharmaceutical Science* 71 (4), 1982, 427-430
- Potard G., Laugel C., Schaefer H., Marty J.P., The stripping technique: in vitro absorption and penetration of five UV filters on excised fresh human skin, *Skin pharmacology and applied skin physiology* 13 (6), 2000, 336-344
- Potts R.O., Guy R.H.; Predicting skin permeability, *Pharmaceutical Research* 9, 1992, 663-669
- Prakash A., Benfield P., Topical mometasone: A review of its pharmacological properties and therapeutic use in the treatment of dermatological disorders, *Drugs* 55 (1), 1998, 145-163
- Refai H., Müller-Goymann C.C., The influence of dilution of topical semisolid preparations on hydrocortisone permeation through excised human stratum corneum, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54, 2002, 143-150
- Renner M.U., Gelatinefilme als Arzneistoffträger, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2003
- Richter T.E., Vergleichende Permeabilitäts- und Penetrationsstudien in vitro an Schweinekornea und Rindernasenmukosa sowie biophysikalische Untersuchungen an potentiellen Formulierungen (Mikroemulsionen), Dissertation, Humboldt-Universität Berlin, 2004
- Riviere J.E., Brooks J.D., Predicting skin permeability from complex chemical mixtures, *Toxicology and Applied Pharmacology* 208, 2005, 99-110
- Rosado C., Rodrigues L.M., Solvent effects in permeation assessed in vivo by skin surface biopsy, *BMC Dermatology* 18, 3-5, 2003
- Rose Ch., Stabilitätsbeurteilung von O/W-Cremes auf Basis der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe DAB 1996, Dissertation, TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 1999
- Roth H.J.; Fenner H.; Arzneistoffe; Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2000

- Sahasranaman S., Issar M., Hochhaus G., Metabolism of mometasone furoate and biological activity of the metabolites, *Drug metabolism and Disposition* 34 (2), 2005, 225-233
- Salminen T., Pulli A., Taskinen J., Relationship between immobilised artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15, 1997, 469-477
- Sanco, Guidance Document on Dermal Absorption 222/2000 rev. 7, European Commission, 2004
- SCCNFP, The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers, 0750/03, Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 2003
- SCCP, Scientific Committee on Consumer Products, Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, 0970/06, 2006
- Schäfer-Korting M., Bock U., Diembeck W., Düsing H.-J., Gamer A., Haltner-Ukomadu E., Hoffmann C., Kaca M., Kamp H., Kersen S., Kietzmann M., Korting H.C., Krächter H.-U., Lehr C.-M., Liebsch M., Mehling A., Müller-Goymann C., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U., Schmidt E., Schreiber S., Spielmann H., Vuia A., Weimer M., Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation, *Alternatives to Laboratory Animals* (eingereicht)
- Schäfer-Korting M., Bock U., Gamer A., Haberland A., Haltner-Ukomadu E., Kaca M., Kamp H., Kietzmann M., Korting H.C., Krächter H.-U., Lehr C.-M., Liebsch M., Mehling A., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U., Schmidt E., Schreiber S., Schröder K.-R., Spielmann H., Vuia A., Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study, *Alternatives to Laboratory Animals* 34, 2006, 283-294
- Schmook F.P., Meingassner J.G., Billich A., Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in-vitro percutaneous absorption, *International Journal of Pharmaceutics* 215, 2001, 51-56
- Schramm G., Einführung in Rheologie und Rheometrie, Gebrüder HAAKE GmbH, Karlsruhe, 2. Auflage, 2000
- Schreiber S., Mahmoud A., Vuia A., Rübbelke M.K., Schmidt E., Schaller M., Kandarova H., Haberland A., Schäfer U.F., Bock U., Korting H.C., Liebsch M., Schäfer-Korting M., Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies, *Toxicology in Vitro* 19, 2005, 813-822

- Shah V.P., Elkins J., Hanus J., Noorizadeh C., Skelly J.P., In Vitro Release of Hydrocortisone from Topical Preparations and Automated Procedure, *Pharmaceutical Research* 8 (1), 1991, 55-59
- Shah V.P., Elkins J., In-Vitro Release from Corticosteroid Ointments, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (9), 1995, 1139-1140
- Shaper E., Untersuchung der perkutanen Resorption von Benzoesäure, Hydrocortison und Testosteron am isolierten perfundierten Rindeuter, Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 2003
- Simonsen L., Hoy G., Didriksen E., Persson J., Melchior N., Hansen J., Development of a New Formulation Combining Calcipotriol and Betamethasone Dipropionate in an Ointment Vehicle, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 30 (10), 2004, 1095-1102
- Stevens A., Lowe J., *Histologie des Menschen*, Chapman + Hall, 2. Auflage, 1997, 355-369
- Stewart B.H., Chan O.H., Use of Immobilized Artificial Membrane Chromatography for Drug Transport Applications, *Journal of Pharmaceuticals Sciences* 87 (12), 1998, 1471-1478
- Stricker H., *Physikalische Pharmazie: Pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen*, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, 1987
- Tadros T.F., *Applied Surfactants: Principles and Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
- Teng X.W., Cutler D.C., Davies N.M., Degradation kinetics of mometasone furoate in aqueous systems, *International Journal of Pharmaceutics* 259, 2003, 129-141
- Testa B., Waterbeemd H., Folkers G., Guy R., *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 2001
- The Merck Index, Windholz M., Budvari S., Blumetti R.F., Otterbein E.S., *An Encyclopaedia of Chemicals and Drugs*, Eleventh Edition, Merck & Co., INC, Rahway, N.J., U.S.A. 1983
- Thoma, *Apothekenrezeptur und -defektur*, 2. Ergänzungslieferung 2004
- Tiller P.R., Mutton I.M., Lane S.J., Bevan C.D., Immobilized Human Serum Albumin: Liquid Chromatography/Mass Spectrometry as a Method of Determining Drug-Protein Binding, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9, 1995, 261-263
- Touitou E., Godin B., Karl Y., Bujanover S., Becker Y., Oleic acid, a skin penetration enhancer, affects Langerhans cells and corneocytes, *Journal of Controlled Release* 80, 2002, 1-7

- USP, The United States Pharmacopeia, USP 29, NF 24, United States Pharmacopeial Convention, INC., 2006
- Valko K., Nunhuck S., Bevan C., Abraham M.H., Reynolds D.P., Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (11), 2003, 2236-2248
- Van de Sandt J.J.M., van Burgsteden J.A., Cage S., Carmichael P.L., Dick I., Kenyon S., Korinth G., Larese F., Limasset J.C., Maas W.J.M., Montomoli L., Nielsen J.B., Payan J.-P., Robinson E., Sartorelli P., Schaller K.H., Wilkinson S.C., Williams F.M., In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39, 2004, 271-281
- Van den Bergh B.A.I., Bouwstra J.A., Junginger H.E., Wertz P.W., Elasticity of vesicles affects hairless mouse skin structure and permeability, *Journal of Controlled Release* 62, 1999, 367-379
- Vermeire A., De Muynck C., Vandenbossche G., Eechaute W., Geerts M.-L., Remon J.P., Sucrose Laureate Gels as a Percutaneous Delivery System for Oestradiol in Rabbits, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 48, 1996, 463-467
- Voigt R., *Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf*, Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden, 1995
- Wagner H., *Charakterisierung des Arzneistofftransportes in Humanhaut unter in-vitro und in-vivo Bedingungen sowie unter Berücksichtigung des Einflusses zweier in-vitro Testsysteme*, Dissertation, Universität des Saarlandes, 2001
- Walker R.B., Smith E.W., The role of percutaneous penetration enhancers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 18, 1996, 295-301
- Welin-Berger K., Neelissen J.A.M., Bergenstahl B., The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 2001, 309-318
- WHO, World Health Organization, First draft report, *Dermal Absorption*, Environmental Health Criteria 235, 2006
- Wilschut A., ten Berge W.F., Robinson P.J., McKone T.E., Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models, *Chemosphere* 30 (7), 1995, 1275-1296

Wissenschaftliche Veröffentlichungen allgemeiner Art

Publikationen:

- Kaca M., Bock U., Jalal M.T., Harms H., Hoffmann C., Müller-Goymann C., Netzlaff F., Schäfer U., Lehr C.-L., Haltner-Ukomadu E., Physicochemical parameters of marker compounds and vehicle properties for in vitro percutaneous absorption studies, Alternatives to Laboratory Animals (eingereicht)
- Schäfer-Korting M., Bock U., Diembeck W., Düsing H.-J., Gamer A., Haltner-Ukomadu E., Hoffmann C., Kaca M., Kamp H., Kersen S., Kietzmann M., Korting H.C., Krächter H.-U., Lehr C.-M., Liebsch M., Mehling A., Müller-Goymann C., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U., Schmidt E., Schreiber S., Spielmann H., Vuia A., Weimer M., Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation, Alternatives to Laboratory Animals (eingereicht)
- Netzlaff F., Kaca M., Bock U., Haltner-Ukomadu E., Meiers P., Lehr C.-M., Schäfer U.F., Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 66 (1), 2007, 127-134
- Schäfer-Korting M., Bock U., Gamer A., Haberland A., Haltner-Ukomadu E., Kaca M., Kamp H., Kietzmann M., Korting H.C., Krächter H.-U., Lehr C.-M., Liebsch M., Mehling A., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U., Schmidt E., Schreiber S., Schröder K.-R., Spielmann H., Vuia A., Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study, Alternatives to Laboratory Animals 34, 2006, 283-294
- Jalal M.T., Bock U., Kaca M., Steffens K.J., Haltner E., In vitro Modelle zur Sicherheitsbewertung von Kosmetika und Dermatika, Kosmetische Medizin, 2/2005, 52-56

Tagungsbeiträge:

- Vuia A., Bock U., Diembeck W., Düsing H.J., Gamer A., Haltner-Ukomadu E., Hoffmann C., Kaca M., Kamp H.G., Kersen S., Kietzmann M., Korting H.C., Krächter H.U., Lehr C.-M., Liebsch M., Mehling A., Müller-Goymann C., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U.F., Schmidt E., Spielmann H., Weimer M., Schäfer-Korting M., Reconstructed human epidermis versus native skin for skin absorption testing- results of the validation study (Poster und Vortrag), 33rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society; Wien (Österreich), 2006
- Vuia A., Bock U., Diembeck W., Düsing H.J., Gamer A., Haltner-Ukomadu E., Hoffmann C., Kaca M., Kamp H.G., Kersen S., Kietzmann M., Korting H.C., Krächter H.U., Lehr C.-M., Liebsch M., Mehling A., Müller-Goymann C., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U.F., Schmidt E., Spielmann H., Weimer M., Schäfer-Korting M., Results of the validation study on percutaneous absorption via reconstructed human epidermis, 13th Congress on Alternatives to Animal Testing (Vortrag), Linz (Österreich), 2006
- Vuia A., Bock U., Diembeck W., Düsing H.J., Gamer A., Haltner-Ukomadu E., Hoffmann C., Kaca M., Kamp H.G., Kersen S., Kietzmann M., Korting H.C., Krächter H.U., Lehr C.-M., Liebsch M., Mehling A., Müller-Goymann C., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U.F., Schmidt E., Spielmann H., Weimer M., Schäfer-Korting M., Skin absorption testing via reconstructed human epidermis- results of the german validation study (Poster), DGPT-Tagung, Mainz, 2006
- Vuia A., Bock U., Haltner-Ukomadu E., Kaca M., Kietzmann M., Korting H.C., Lehr C.M., Liebsch M., Netzlaff F., Niedorf F., Rübbelke M.K., Schäfer U.F., Schmidt E., Schreiber S., Spielmann H., Schäfer-Korting M., Prevalidation Study on Testing Percutaneous Absorption via Reconstructed Human Epidermis (Poster + ALTEX 22, Special Issue, 2005), 5th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Berlin, 2005

